

Analyse der Funktion von SOCS3 in trophoblastären Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Torben de la Motte

geboren am 06.09.1980 in Jena

2009

Die vorliegende Dissertation wurde im Labor von
Herrn PD Dr. med. Udo Markert
im Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität,
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
angefertigt.

Gutachter:

1. **PD Dr. med. Udo Markert** (Plazentalabor der Universitätsfrauenklinik Jena, Abteilung Geburtshilfe)
2. **Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer** (Frauenklinik Universitätsklinikum Würzburg)
3. **Dr. rer. nat. Ute-Christiane Hipler** (In-vitro-Forschungslabor der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikum Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.06.2010

meiner Familie

„Menschlicher Scharfsinn wird niemals eine schönere Erfindung ersinnen, einfacher und direkter als die Natur, weil in ihren Erfindungen nichts fehlt und nichts überflüssig ist.“

Leonardo da Vinci (1452-1519)



INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	
2.1 Motivation der Arbeit	5
2.2 Der Ursprung neuen Lebens – Schwangerschaft und Plazentation	7
2.2.1 Von der Befruchtung der Eizelle bis zur Implantation	7
2.2.2 Die Implantation der Blastozyste	8
2.2.3 Differenzierung der trophoblastären Zellen	9
2.2.4 Die Invasion der Trophoblasten	10
2.2.4.1 Integrine als „Wegweiser“ der Invasion	11
2.2.4.2 Proteine als „Werkzeuge“ – MMP und ihre Inhibitoren	11
2.3 Regulation der Plazentation	12
2.3.1 Bedeutung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren	12
2.3.1.1 LIF und dessen Funktion während der Schwangerschaft	13
2.3.2 Intrazelluläre Regulationsprozesse	14
2.3.2.1 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg	14
2.3.2.2 STAT3 – Bedeutung für Schwangerschaft und Tumorwachstum	16
2.3.2.3 Negativregulation der JAK/STAT-Signalkaskade	16
2.3.2.3.1 Feedback-Hemmung durch SOCS-Proteine	17
2.3.2.4 Die Relevanz von SOCS3 für Schwangerschaft und Krebsentstehung	18
3. Ziele der Arbeit	
3.1 Ziele der Arbeit	20
3.2 Arbeitshypothesen	20
4. Methodik	
4.1 Zellkultur	21
4.1.1 JAR-Zelllinie	21
4.1.2 SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie	21

4.1.3	Kultivierung der Zelllinien	21
4.2	RNA-Interferenz	22
4.2.1	Hintergrund	22
4.2.2	„Knockdown“ mittels siRNA	23
4.2.2.1	Annealing der siRNA	23
4.2.2.2	Transfektion der Zellen	24
4.3	Lysieren der Zellen zur Proteinisolation	25
4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
4.5	SDS-PAGE und Western Blot	26
4.5.1	Hintergrund	26
4.5.2	Durchführung	26
4.6	Bestimmung der Genexpression	27
4.6.1	Hintergrund	27
4.6.2	RNA-Isolierung	27
4.6.3	RNA-Konzentrationsbestimmung und –Gelelektrophorese	28
4.6.4	Reverse Transkription	29
4.6.4.1	Hintergrund	29
4.6.4.2	Durchführung	29
4.6.5	PCR	30
4.6.5.1	Hintergrund	30
4.6.5.2	Durchführung	30
4.6.6	Real-Time PCR	32
4.6.6.1	Hintergrund	32
4.6.6.2	Durchführung	33
4.6.6.3	Auswertung	34
4.7	Funktionelle Tests	35
4.7.1	Hintergrund	35
4.7.2	Proliferationsassay	35
4.7.3	Migrationsassay	35
4.7.4	Invasionsassay	36
4.8	Durchflusszytometrie	36
4.8.1	Hintergrund	36
4.8.2	Durchführung	37
4.9.	Statistische Auswertung	37

5. Ergebnisse

5.1	Nachweis des RNAi vermittelten SOCS3-„Knockdowns“	38
5.1.1	Genexpression von SOCS3 nach „Knockdown“ mit siRNA und shRNA	38
5.1.2	Nachweis des Protein-„Knockdown“ in siRNA- und shRNA-transfizierten JAR-Zellen	41
5.2	Nachweis des Einflusses von LIF auf die SOCS3-Expression	43
5.3	Einfluss des SOCS3-„Knockdown“ auf die STAT3-Phosphorylierung	44
5.4	Funktionelle Tests	46
5.4.1	Vorversuch	46
5.4.2	Proliferationsassay	47
5.4.3	Migrationsassay	49
5.4.4	Invasionsassay	50

6. Diskussion

6.1	SOCS3-„Knockdown“ mittels RNAi	53
6.2	STAT3-Phosphorylierung	55
6.3	SOCS3-Protein-„Knockdown“ trotz SOCS3 mRNA-Erhöhung	57
6.4	Einfluss des SOCS3-„Knockdown“ auf trophoblastäre Zellen	60

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

7.1	Schlussfolgerungen	63
7.2	Ausblick	64

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Quellenverzeichnis der Abbildungen	66
Literaturverzeichnis	67

Anhang

Lebenslauf	I
Publikationsliste	II
Danksagung	IV
Ehrenwörtliche Erklärung	V
Verwendete Geräte und Materialien	VI
Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Gelen	XI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Acrylamid
AAS	antibiotisch-antimykotische Lösung
bp	Basenpaar(e)
cDNA	Komplementäre DNA
CIS	Zytokin induzierbares SH2 enthaltendes Protein
Ct	Threshold cycle
CTB	Zytotrophoblast
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
EZM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
enCTB	Endovaskulärer CTB
evCTB	Extravillöser CTB
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HRP	Horse-radish Peroxidase
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
inCTB	Interstitieller CTB
JAK	Januskinase
KIR	Kinase inhibierende Region
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Proteinaseinhibitor
PIAS	Protein Inhibitoren aktivierter STAT
RT	Reverse Transkription
RTS	Reverse Transkriptase
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
rtPCR	Real-time PCR
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	Src-Homologieregion 2
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SOCS	Suppressor der Zytokin-Signalgebung
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
STB	Synzytiotrophoblast
TIMP	Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen
TYK	Tyrosinkinase
vCTB	Villöser CTB

1. Zusammenfassung

Die Entstehung neuen Lebens ist ein faszinierender Vorgang und seit jeher Antrieb für wissenschaftliche Forschung. Die molekularen Mechanismen dieses biologischen Wunders sind jedoch bis heute nur sehr unvollständig geklärt. In diesem Zusammenhang ist der Vorgang der Plazentation von besonderem klinischem Interesse, da er für das Verständnis vieler schwangerschaftsassoziierter Krankheiten von Bedeutung sein könnte. Überdies bestehen viele Ähnlichkeiten zwischen in den Uterus einwandernden Trophoblastzellen und malignen Tumorzellen, die im Fokus onkologischer Forschung stehen.

Die für Tumorwachstum und Schwangerschaft relevanten Zellfunktionen werden vor allem über den Signaltransduktor und Aktivator der Transkription-3 (STAT3), ein intrazelluläres Regulationsmolekül, gesteuert. Dessen Stimulation steht am Ende der so genannten Januskinase/Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (JAK/STAT) -Signaltransduktionskaskade, die von Zytokinen, wie dem für die Schwangerschaft bedeutsamen Leukämie inhibierenden Faktor (LIF), aktiviert wird. Ein wichtiger Negativregulator von STAT3 scheint der Suppressor der Zytokin-Signalgebung-3 (SOCS3) zu sein, das bei veränderter Expression mit plazentaren Entwicklungsstörungen und Entartung von Zellen in Verbindung gebracht wird.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation der Einfluss einer reduzierten SOCS3-Expression auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten trophoblastärer Zellen untersucht.

Die Chorionkarzinomzelllinie JAR diente hierbei als Modell für das Verhalten invasiver Trophoblastzellen. Die Verminderung der SOCS3-Expression wurde mittels RNA-Interferenz, einem posttranskriptionellen Mechanismus der Genregulation, realisiert. Dabei erfolgte sowohl ein transienter „Knockdown“ mit Hilfe von small interfering RNA (siRNA) als auch ein stabiler, vektorvermittelter „Knockdown“ mit short hairpin RNA (shRNA). Mittels Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot wurde der Erfolg der Transfektion auf Protein-Ebene kontrolliert, während die Verminderung der Messenger RNA (mRNA) Menge von SOCS3 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. real-time PCR (rtPCR) nachgewiesen werden sollte. Anschließend erfolgten Proliferations-, Migrations- und Invasionsassays um den Einfluss des SOCS3-„Knockdowns“ auf das Zellverhalten zu untersuchen. Diese Tests wurden jeweils mit unstimulierten JAR-Zellen sowie nach Stimulation mit dem schwangerschaftsrelevanten Zytokin LIF durchgeführt.

Im Western Blot konnte ein erfolgreicher „Knockdown“ von SOCS3 nachgewiesen werden, wobei die stabile vektorvermittelte Transfektion eine wesentliche höhere Effizienz als die mit siRNA aufwies. In der rtPCR zeigte sich dennoch keine Verminderung der SOCS3 mRNA in den siRNA-transfizierten JAR-Zellen, während in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie signifikant erhöhte Mengen mRNA detektiert wurden.

In den funktionellen Tests fand sich eine leicht hemmende Wirkung des SOCS3-„Knockdowns“ auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten unstimulierter JAR-Zellen. Die Stimulation mit LIF förderte jedoch Proliferation und Migration, wobei diese Steigerung in den „Knockdown“-Zellen höher ausfiel als in den Kontrollen. Im Gegensatz dazu wirkte sich die Stimulation mit LIF leicht hemmend auf die Invasivität der JAR-Zellen aus.

Obwohl SOCS3 ein wichtiger Regulator des JAK/STAT-Signalweges ist, konnten die Ergebnisse den erwartet starken Einfluss des „Knockdowns“ auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von JAR-Zellen nicht bestätigen. Daher lässt sich vermuten, dass bei einem SOCS3-Defizit andere Negativregulatoren wie z.B. Protein Inhibitoren aktivierter STAT einspringen um eine überschießende Stimulation durch aktiviertes STAT3 zu unterbinden. Allerdings sind die Ergebnisse vor dem Hintergrund methodischer Probleme, wie möglicher Off-Target-Effekte der verwendeten siRNA, einer kritischen Betrachtung zu unterziehen. Eine Überprüfung der Resultate nach Verbesserung der Methodik wäre daher anzustreben.

Dennoch bestätigt die Arbeit in der Literatur beschriebene Beobachtungen, wonach sich eine erhöhte STAT3-Aktivierung in verschiedenen Zellen unterschiedlich auf deren Verhalten auswirkt. Dies lässt für weitere Arbeiten die Verwendung von Primärzellen, aufgrund besserer Vergleichbarkeit zum physiologischen System, als sinnvoll erscheinen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Dissertation, dass SOCS3 ein wichtiger Regulator in der molekularen Steuerung trophoblastärer Zellen ist, jedoch nicht allein, in Form eines Defizits, für schwangerschaftsassozierte Krankheiten verantwortlich sein kann.

2. Einleitung

2.1 Motivation der Arbeit

Das Verstehen der Schwangerschaft als faszinierenden Ursprung des menschlichen Lebens ist seit jeher Antrieb für wissenschaftliche Forschung. Dabei sind jedoch bis heute wesentliche Fragen dieses einmaligen biologischen Vorganges nicht vollständig geklärt. Wie ist es möglich, dass der semiallogene Embryo vom Immunsystem der Mutter nicht abgestoßen wird? Wie kommt es stattdessen zu einer Einwanderung von Trophoblastzellen in die Gebärmutter, wie man sie sonst nur von Tumorzellen kennt? Und wie wird diese Invasion im Gegensatz zu der von Krebszellen reguliert? Dies sind einige der Fragen mit denen sich die Reproduktionsimmunologie beschäftigt. Dabei stehen auch immer Pathologien im Fokus, die auf einer Fehlregulation dieser Plazentation beruhen. So kann z. B. eine gestörte Plazentation mit einer Plazentainsuffizienz einhergehen, die mit einer Erhöhung des Risikos von Präeklampsie oder intrauteriner Wachstumsrestriktion korreliert. Im Gegensatz dazu findet man bei Krankheitsbildern wie der Blasenmole oder dem Chorionkarzinom eine erhöhte Proliferations- bzw. Invasionsaktivität vor.

Für eine intakte Schwangerschaft ist also ein Gleichgewicht zwischen pro-invasiven/proliferativen Faktoren und deren Antagonisten von entscheidender Bedeutung. Eine wichtige Rolle in diesem Regulationsprozess scheinen der Signaltransduktor und Aktivator der Transkription-3 (STAT3) und der Suppressor der Zytokin-Signalgebung-3 (SOCS3) zu spielen, die für den Ablauf einer normalen Schwangerschaft essentiell sind (Boyle und Robb 2008). Das Regulationsprotein SOCS3 wird nach STAT3-Aktivierung exprimiert und übt im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus eine Kontrollfunktion aus (Kisseleva et al. 2002).

Was aber passiert wenn die Expression dieses Regulationsproteins gestört ist? Zum einen wird eine Verminderung von SOCS3 in Trophoblastzellen mit plazentaren Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht (Boyle und Robb 2008), auf der anderen Seite diskutiert man eine Entartung von Zellen durch dauerhafte STAT3-Aktivierung aufgrund reduzierter SOCS3-Expression (Frank 2007). Ziel der vorliegenden Arbeit soll es daher sein, die Auswirkung einer verminderten SOCS3-Bildung in trophoblastären Zellen auf deren Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten zu untersuchen.

Als Modell für Trophoblastzellen dient die Chorionkarzinomzelllinie JAR, in der die SOCS3-Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi) effektiv reduziert werden soll. Anschließend wird mit Hilfe von funktionellen Tests der Einfluss des Regulators auf die entsprechende Zellphysiologie geprüft. Diese Tests werden sowohl mit unstimulierten Zellen durchgeführt, als auch nach Stimulation mit dem für die STAT3-Signaltransduktion relevanten Zytokin Leukämie inhibierender Faktor (LIF).

Demnach soll geprüft werden, ob eine Intensivierung der STAT3 vermittelten Effekte durch den SOCS3-„Knockdown“ stattfindet und ob diese durch die Stimulation mit LIF verstärkt wird.

2.2 Der Ursprung neuen Lebens – Schwangerschaft und Plazentation

Die Schwangerschaft, die auch als Gravidität (lat. *gravitas*: „Schwere“) bezeichnet wird, umfasst den Zeitraum von der Befruchtung der Eizelle bis zur Geburt des Kindes.

Die Plazentation beschreibt die Zeitspanne in der sich das für die Versorgung des Embryos notwendige Organ, die Plazenta (lat. *placenta*: „Kuchen“), entwickelt. Darüber hinaus stellt der Mutterkuchen zum einen die Grenzfläche zwischen Mutter und Kind dar und ist damit entscheidend an der Modulation des mütterlichen Immunsystems beteiligt, zum anderen nimmt er durch die Bildung von Hormonen endokrinologische Funktionen wahr.

2.2.1 Von der Befruchtung der Eizelle bis zur Implantation

Im Ovar der Frau findet ein von Hormonen gesteuerter, regelmäßig wiederkehrender, ca. 28tägiger Zyklus statt, in dem die Eireifung erfolgt. In der Mitte dieses Zyklus erfolgt unter dem Einfluss des luteinisierenden Hormons die so genannte Ovulation, bei der die Oozyte in den Eileiter ausgestoßen wird. Innerhalb von 24 h kommt es hier zur Befruchtung durch die aszendierten Spermien. Nach der Befruchtung wandert die nun Zygote genannte Zelle durch die Eileiter in Richtung Uterus. Auf diesem Weg findet die so genannte Furchung statt, ein Prozess, bei dem die Zygote eine Reihe rasch aufeinander folgende Zellteilungen ohne Zunahme der Größe durchmacht. Nach etwa drei Tagen wird die nun aus ca. 32 Blastomeren bestehende Zygote Morula (Maulbeere) genannt und tritt in die Gebärmutterhöhle ein. Am vierten Tag nach der Befruchtung tritt Flüssigkeit aus dem Uteruslumen in die Morula über und es bildet sich die so genannte Blastozyste, die aus einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblast, und einer inneren Zellmasse, dem Embryoblast, besteht. Ersterer bildet in der Folge die Plazenta, während sich aus dem Embryoblast das Kind entwickelt. In den folgenden zwei Tagen wird die Blastozyste in der Gebärmutter durch das Sekret der Uterusdrüsen ernährt, bis sie sich schließlich an das Epithel der Uterusschleimhaut anlagert und die Implantation beginnt.

Um sowohl die Ernährung als auch eine erfolgreiche Einnistung der Blastozyste zu gewährleisten, laufen während des menstruellen Zyklus und nach der erfolgreichen

Befruchtung der Eizelle Umbauvorgänge am Endometrium des Uterus ab. Diese Veränderungen werden von Hormonen gesteuert, wobei es nach einer Menstruation zunächst unter Einfluss von Östrogen zu einem Aufbau der Schleimhaut mit Vermehrung von Drüsen und Spiralarterien kommt. Nach der Ovulation steigt der Progesteronspiegel an, wodurch es zum Umbau des Endometriums kommt. Die Spiralarterien wachsen jetzt bis an die oberflächlichen Schichten der Schleimhaut heran und knäueln sich zunehmend auf, während die Drüsen sich erweitern und glykogenreiches Sekret bilden. Durch eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle wird dieser Umbau der Uterusschleimhaut aufrechterhalten und alle Bedingungen für das erfolgreiche Einnisten der Blastozyste sind somit gegeben (Moore 1990).

2.2.2 Die Implantation der Blastozyste

Bei der Implantation handelt es sich um einen fein regulierten Prozess, in dem sich die Blastozyste an das Endometrium anlagert, um daraufhin in die Schleimhaut einzuwandern und sich dort einzunisten. Dies ist nur in einem kurzen Zeitraum, dem so genannten Implantationsfenster möglich, welches sich etwa zwischen dem Tag 20 und Tag 24 eines 28tägigen weiblichen Zyklus befindet (Murray und Lessey 1999). Die Anlagerung der Blastozyste an das mütterliche Endometrium wird zum einen über kleine Vorwölbungen des Uterusepithels, die Pinopidien, als auch über Adhäsionsmoleküle vermittelt (Fitzgerald et al. 2007). Diese Integrine bzw. Selectine befinden sich sowohl am Endometrium als auch auf der äußeren trophektodermalen Zellschicht der Blastozyste und sind für den Zell-Zell-Kontakt unabdingbar. Hat sich die Blastozyste erfolgreich angelagert, durchdringt sie das Uterusepithel und die Basalmembran mit Hilfe von speziellen Enzymen, so genannten Matrixmetalloproteinasen (MMP), die vom Trophoblast gebildet und sezerniert werden. So wird der Kontakt zum kapillar- und drüsenreichen Uterusstroma hergestellt, das sich unter Einfluss von Hormonen und Zytokinen zur so genannten Dezidua umwandelt (Salamonsen et al. 2003). Die sich dabei vergrößernden und Glykogen aufnehmenden Stromazellen sind für die Ernährung des Keimes zuständig bis dieser später direkt vom mütterlichen Blut versorgt wird (Moore 1990).

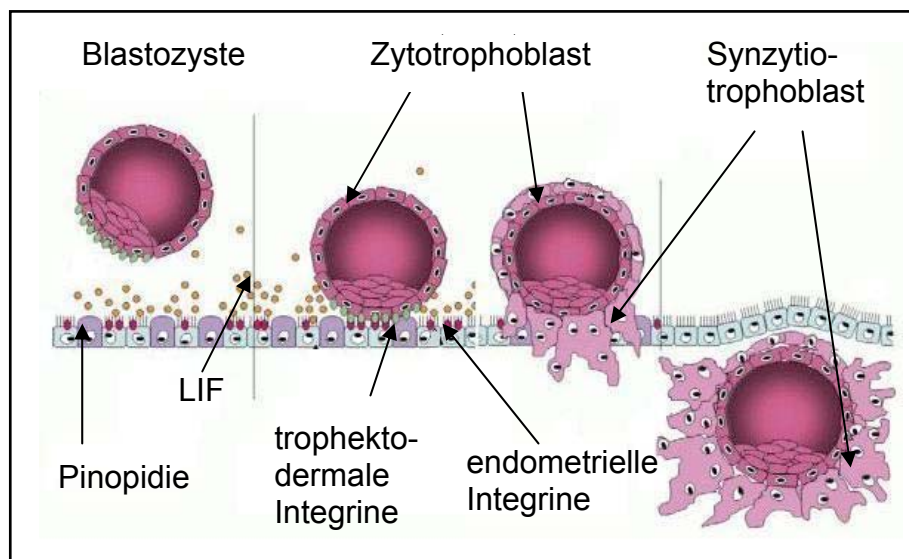


Abbildung 2.1: Die Implantation der Blastozyste

2.2.3 Differenzierung der trophoblastären Zellen

Während der Implantation der Blastozyste findet eine Differenzierung der den Embryoblast umgebenden trophektodermalen Zellen statt. Dabei wird die einzellige Stammzellschicht nach Kontakt des Keimlings zur Uterusschleimhaut villöser Zytotrophoblast (vCTB) genannt. Von dieser Stammzellschicht aus proliferieren die Zellen und Verschmelzen unter Aufgabe ihrer Zellgrenzen zu einer vielkernigen Protoplasmamasse, die Synzytiotrophoblast (STB) genannt wird. Der vordrängende STB umgibt den vCTB und bildet so das Bett für die Einnistung der Blastozyste. Er übernimmt darüber hinaus auch endokrinologische Aufgaben, indem er Hormone wie humanes Choriongonadotropin β bildet, das für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft essentiell ist (Licht et al. 2001) und zur Feststellung der frühen Schwangerschaft herangezogen werden kann. Darüber hinaus bilden der STB und der vCTB gemeinsam zwei Arten von Zotten aus. Die Chorionzotten, floating villi genannt, dienen der Vergrößerung der Fläche zwischen dem Embryo und mütterlichem Blut und damit dem Stoffaustausch, während die so genannten Haftzotten (anchoring villi) die Plazenta im Endometrium verankern. Im Gegensatz zu den schwimmenden Chorionzotten sind die Haftzotten nicht gänzlich vom STB umgeben. Vielmehr durchbrechen Zellen des vCTB den STB und bilden Zellsäulen

aus, die invasiv in das deziduale Stroma einwachsen. Auf diesem Weg erfolgt eine Differenzierung der nun extravillöser Zytotrophoblast (evCTB) genannten Zellen. Die sich an der Basis der Säule befindlichen Zellen des evCTB sind denen des vCTB sehr ähnlich und zeichnen sich vor allem durch eine hohe Proliferationsrate aus. Am distalen Ende der Zellsäule hat sich das Erscheinungsbild dieser Zellen stark verändert. Unter Aufgabe ihrer mitotischen Aktivität tritt nun ein invasives Wachstumsmuster in den Vordergrund (Bischof und Irminger-Finger 2005). Im weiteren Verlauf der Invasion der Zellen kann zwischen zwei Typen des evCTB unterschieden werden. Die tiefer in das dezidualisierte Endometrium bzw. proximale Drittel des Myometrium einwachsenden Zellen bezeichnet man als interstitiellen CTB (inCTB). Andere Trophoblastzellen wandern in die mütterlichen Spiralarterien ein, kleiden sie von innen aus und ersetzen die glatte Muskulatur. Diese endovaskulärer CTB (enCTB) genannten Zellen wandeln die uterinen Spiralarterien in weite, von der autonomen Blutdruckregulation unabhängige Blutgefäße um, wodurch die stetige Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet wird. Diese physiologischen Umbauvorgänge sind Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft, was durch den Zusammenhang von erfolgloser Umwandlung der Spiralarterien mit Krankheiten wie Präeklampsie und intrauteriner Wachstumsrestriktion verdeutlicht wird (Lyll et al. 1999).

2.2.4 Die Invasion der Trophoblasten

Die Fähigkeiten der Trophoblastzellen zur Invasion in das mütterliche Gewebe weist erstaunlich viele Ähnlichkeiten mit dem invasiven Wachstum von Tumorzellen auf. So finden sich Gemeinsamkeiten bei der Degradierung extrazellulärer Matrix mit Hilfe von MMP ebenso wie auf intrazellulärer Ebene bei der Signaltransduktion. Darauf soll im Weiteren näher eingegangen werden. Im Gegensatz zu maligner Krebszellen ist der physiologische Prozess der Trophoblasteninvasion jedoch streng räumlich und zeitlich reguliert. Wie genau jedoch findet diese Regulation im Gegensatz zum unkontrollierten Tumorstadium statt? Das ist seit geraumer Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung, wobei bisher einige Sachverhalte aufgeklärt werden konnten, während andere noch völlig unklar bleiben. So ist man auch heute noch weit davon entfernt das gesamte Puzzle zusammenzusetzen.

2.2.4.1 Integrine als „Wegweiser“ der Invasion

Bislang scheint klar zu sein, dass die Invasionsrichtung der Trophoblastzellen von ihrem Integrin-Expressionsmuster bestimmt wird. Diese Adhäsionsmoleküle sind in der Lage an Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagen, Laminin und Fibronectin zu binden. Während der Differenzierung der Trophoblastzellen kommt es zu Veränderungen im Expressionsmuster ihrer Integrine, die für die jeweilige Umgebung spezifisch zu sein scheint. So bildet die vCTB-Stammzellschicht beispielsweise Laminin-bindende Integrine, mit denen sie sich an der Laminin-haltigen Basalmembran verankert. Bei der Umwandlung zu evCTB in den Zellsäulen, exprimieren sie nun Fibronectinrezeptoren, was ihnen die Möglichkeit gibt in das Fibronectin-reiche Interstitium des Uterusstromas zu migrieren. Die weitere Differenzierung zu inCTB oder enCTB geht ebenfalls mit einer Veränderung des Integrinmusters einher, wodurch die Invasion in das spezifische Gewebe ermöglicht und reguliert wird (Damsky et al. 1994, Lessey 1995).

2.2.4.2 Proteine als „Werkzeuge“ – MMP und ihre Inhibitoren

Die Migration und Invasion der Trophoblastzellen ist jedoch kein passiver Vorgang, der allein durch physikalischen Druck der Zellen auf das mütterliche Gewebe realisiert wird. Vielmehr benötigt der Embryo Enzyme, die ihm gewissermaßen als Werkzeug dienen, mit dem er Komponenten der EZM degradiert und die ihm so die Invasion ermöglichen. Hierzu bedient er sich der Hilfe verschiedener Proteasen, wobei die bereits erwähnten Matrixmetalloproteinasen eine besondere Rolle spielen. Bei den MMP handelt es sich um eine Familie Zink-abhängiger Endopeptidasen, die entsprechend ihrer Substratspezifität in der Lage sind Proteine der EZM zu spalten. Sie werden in drei Gruppen, die Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysine unterteilt. Den beiden Gelatinasen A und B (MMP-2 und -9) scheint bei der Invasion der Blastozyste in den Uterus eine entscheidende Rolle zuzukommen. Sie sind in der Lage Kollagen Typ IV, den wichtigsten Bestandteil von Basalmembranen, zu spalten und somit das Uterusepithel als entscheidende Barriere zu durchbrechen (Staun-Ram et al. 2004). Da in invadierenden Trophoblastzellen sowie im endometriellen Stroma jedoch auch andere Proteasen der MMP-Familie zu finden sind, kann man, wie auch bei den Integrinen, von einer Änderung des Expressionsmusters während

des Invasionsprozesses ausgehen (Murray und Lessey 1999). Um aber eine unkontrollierte Einwanderung der embryonalen Zellen zu vermeiden, muss die Aktivität der MMP genau reguliert werden. Das geschieht mit Hilfe der Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (TIMP). Diese Enzyme binden an das aktive Zentrum der MMP, hemmen deren proteolytische Aktivität und balancieren somit das Gleichgewicht zwischen deren Aktivierung und Inhibition. Die TIMP werden sowohl von embryonalen als auch von den dezidualen Zellen gebildet (Murray und Lessey 1999), was zum einen für eine Selbstregulation der Trophoblastzellen spricht, aber auch die Rolle des uterinen Stromas als Barriere für unkontrollierte Invasion unterstreicht.

2.3 Regulation der Plazentation

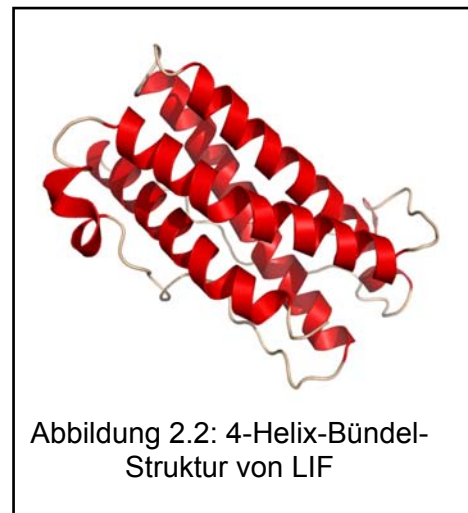
2.3.1 Bedeutung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Es stellt sich jedoch die Frage wie genau dieses Gleichgewicht zwischen den pro-invasiven MMP und den ihnen gegenüberstehenden TIMP reguliert wird? Eine wichtige Rolle hierbei scheinen Zytokine und Wachstumsfaktoren zu spielen, die sowohl vom uterinen Gewebe als auch von den embryonalen Zellen selbst stammen können. Neben Regulationsfunktionen innerhalb der Invasion scheinen diese Proteine für den gesamten Prozess der Plazentation von entscheidender Bedeutung zu sein. So sind beispielsweise Interleukin-1 (IL-1) und der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) für die Anlagerung der Blastozyste an das Uterusepithel und die Implantation unerlässlich (Sharkey 1998). Andere Zytokine, unter anderem der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), regulieren wiederum die Proliferation der Trophoblastzellen, während der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-2 (IGF-2), EGF und HGF die Migration dieser Zellen beeinflussen (Fitzgerald et al. 2005b). Die oben angesprochene trophoblastäre Invasion wird neben einigen anderen Faktoren vor allem durch Interleukin-6 (IL-6) und LIF kontrolliert (Fitzgerald et al. 2007, Meisser et al. 1999). Somit wird deutlich, dass die Regulation mit Hilfe von Zytokinen ein hoch

komplexer Prozess ist, in dem den meisten von ihnen an mehreren Stellen wichtige Funktionen zukommen.

2.3.1.1 LIF und dessen Funktion während der Schwangerschaft

Der Leukämie inhibierende Faktor ist ein Glykoprotein, das zur IL-6-Familie gehört und dem für die gesamte Schwangerschaft besondere Bedeutung zukommt. Zum einen scheint es eine Schlüsselrolle bei der Implantation der Blastozyste zu spielen und zum anderen ist es entscheidend an der Regulation der Trophoblastendifferenzierung und -invasion beteiligt. LIF wird vor allem von den endometriellen Drüsen des Uterus gebildet, wobei um den vierten Tag der



Schwangerschaft die höchsten Konzentrationen zu verzeichnen sind. Hierbei zeigte sich, dass die Expression mit der Entwicklung der Blastozyste korreliert und der Implantation stets vorangeht (Bhatt et al. 1991). Die Bedeutung für eine erfolgreiche Einnistung des Embryos wird durch die Tatsache unterstrichen, dass Frauen mit unklarer Infertilität signifikant niedrigere Konzentrationen an LIF aufweisen als fruchtbare Frauen (Laird et al. 1997). Der Stellenwert von LIF für die Implantation erscheint umso größer, da seine Funktion als Regulator bei der Differenzierung von Trophoblastzellen zum invasiven extravillösen Typ gezeigt werden konnte (Nachtigall et al. 1996). Bezüglich des Einflusses von LIF auf das Invasionsverhalten von Trophoblastzellen gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. So konnte zum einen eine Stimulation der Invasion über gesteigerte MMP-Expression nachgewiesen werden (Fitzgerald et al. 2005b), während andere Autoren eine Hemmung der Invasion durch LIF beschreiben (Bischof et al. 1995). Ungeachtet dieser Differenzen scheint die Bedeutung von LIF für eine erfolgreiche Schwangerschaft unbestritten (Vogiagis und Salamonsen 1999).

2.3.2 Intrazelluläre Regulationsprozesse

Auf welche Weise aber findet die Regulation der Invasion auf intrazellulärer Ebene statt und wie erfolgt dabei die Signalübertragung der oben genannten Zytokine, insbesondere von LIF, ins Zellinnere? Ein entscheidender Zytokin-aktivierter Signalweg scheint hierbei die Januskinase/Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription-Kaskade (JAK/STAT-Kaskade) zu sein, da allen oben genannten Zytokinen STAT3 als intrazellulärer Mediator gemein ist. Auf dessen zentrale Bedeutung für die Schwangerschaft sowie für invasives Zellwachstum soll später ausführlicher eingegangen werden.

2.3.2.1 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

Damit Zytokine ihre verschiedenen Wirkungen auf Zellen ausüben können, müssen sie zunächst an den für sie spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche binden. Im Falle des JAK/STAT-Signalübertragungsweges, der neben Trophoblastzellen in vielen anderen Zelltypen wie Lymphozyten oder Zellen des Endometriums vorkommt, besitzen die Rezeptoren keine eigene intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität, sondern sind mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, den Januskinasen, assoziiert. Diese, nach dem zweigesichtigen römischen Gott Janus benannten Proteine, werden durch Bindung des Liganden an den Rezeptor und anschließende Dimerisierung mit dem Transmembranprotein gp130 rekrutiert. Daraufhin phosphorylieren sie sich gegenseitig, was zu ihrer Aktivierung führt. Die aktivierten JAK phosphorylieren jetzt bestimmte Tyrosinreste des Rezeptors, die ihrerseits als Bindungsstelle für die STAT-Moleküle dienen. Nach deren Bindung an den Rezeptor werden auch diese von der JAK an spezifischen Tyrosinketten phosphoryliert, wodurch sie nach Dissoziation vom Rezeptor die Fähigkeit erlangen Dimere zu bilden. Die aktivierten Homo- oder Heterodimere wandern in den Zellkern und regulieren die Expression spezifischer Zielgene durch Bindung an ihre Promotorregionen (Alberts et al. 2004). Wie wird nun aber die Spezifität der unterschiedlichen Zytokine für bestimmte Zielgene erreicht? Das geschieht zum einen an mehreren Punkten des Signaltransduktionsweges und zum anderen durch die Vielfalt der evolutionär hoch verschiedenen Januskinasen (JAK1-3 und TYK2) und 7 verschiedenen STAT (STAT1-4, STAT5a, STAT5b, STAT6) (Leonard und O'Shea 1998).

Bindet ein Zytokin an seinen spezifischen Rezeptor, so besteht für deren dimere Untereinheiten die Möglichkeit verschiedene JAK zu rekrutieren. Die JAK aktivieren ihrerseits nur ganz bestimmte STAT, die wiederum die Chance haben sich zu Homo- oder Heterodimeren zusammenzulagern. Durch deren unterschiedliche Affinitäten zu den Promotorregionen verschiedener Gene ergibt sich im gesamten Signaltransduktionsweg eine große Variabilität, die es erlaubt das diverse Zytokine die Expression mehrerer Gene regulieren. Darüber hinaus existieren noch eine Reihe anderer Regulationsproteine, die an STAT binden können und somit die Transkription weiterer Gene regulieren (Briscoe et al. 1994).

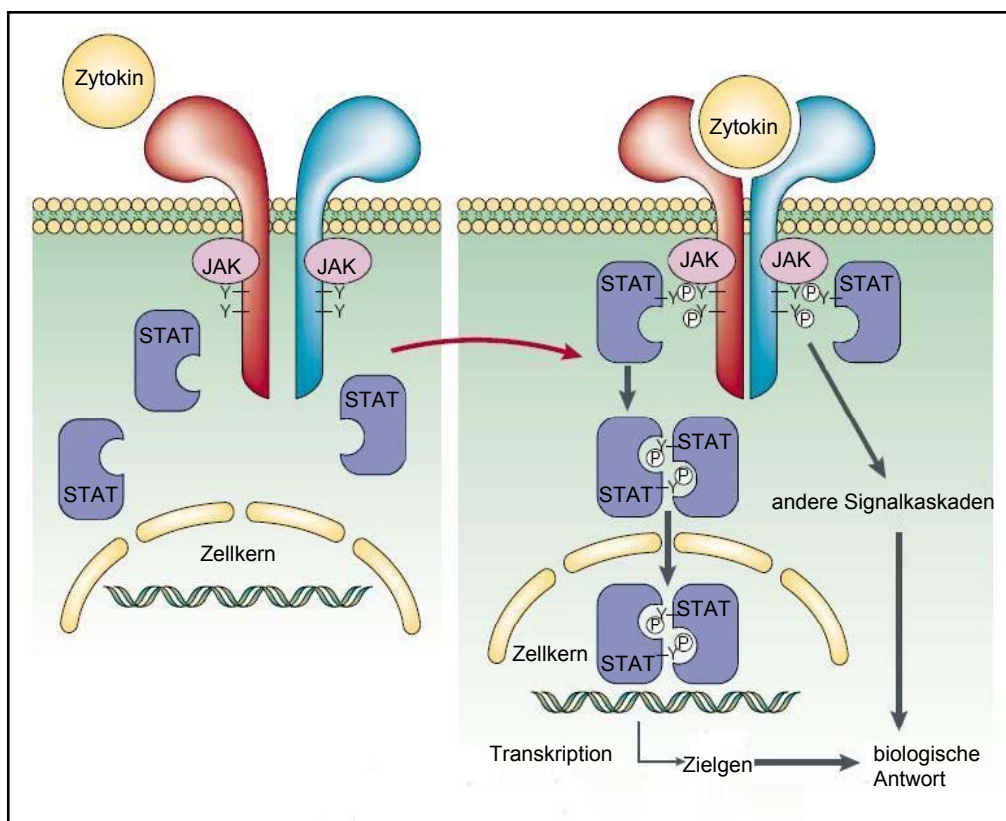


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der JAK/STAT Signalkaskade

Da gezeigt werden konnte, dass auch über andere Kaskaden, wie verschiedene Tyrosin- und Serinkinase-Signalwege, die Aktivität von STAT reguliert wird, scheint ihnen die Aufgabe eines intrazellulären Konvergenzpunktes zuzukommen (Frank 2007). Hierüber können offensichtlich die Effekte mehrerer verschiedener Stimuli integriert werden.

2.3.2.2 STAT3 – Bedeutung für Schwangerschaft und Tumorwachstum

Welche Schlüsselrolle solchen Proteinen zukommen kann, zeigt das Beispiel des schon angesprochenen STAT3, das für die Schwangerschaft von essentieller Bedeutung zu sein scheint. STAT3 ist gemeinsamer Mediator der meisten schwangerschaftsrelevanten Zytokine, inklusive LIF, und findet sich im embryonalen als auch im maternalen Gewebe während der Plazentation (Fitzgerald et al. 2007). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass STAT3 unverzichtbar für die Embryogenese ist, da STAT3-„Knockout“-Embryonen schon in einer frühen Phase der Entwicklung degenerieren und sterben (Kisseleva et al. 2002). Auch ein Zusammenhang zwischen der Invasivität von Trophoblastzellen und LIF-induzierter STAT3-Aktivierung konnte gezeigt werden.

In JEG-3 Chorionkarzinomzellen, die als Model für invasive Trophoblastzellen dienen, konnte nach dieser Aktivierung eine Verminderung von TIMP-1 und eine gesteigerte Expression von Caspase-4 beobachtet werden. Beide Proteasen wurden bereits im Zusammenhang mit Implantation und invasivem Zellwachstum beschrieben. Die Verminderung von TIMP, als Inhibitor der für die Invasivität des CTB wichtigen MMP9, lässt auf eine gesteigerte Invasion schließen. Die erhöhte Expression von Caspase-4, die über die Bildung von Interleukin-1 β die TIMP-1 Konzentration in uterinen Stromazellen vermindert, scheint diese Bedeutung für die Invasion zu unterstreichen (Fitzgerald et al. 2005b).

Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen dem invasiven Verhalten von Trophoblastzellen und Krebszellen verwundert es nicht, dass STAT3 auch hier im Fokus der wissenschaftlichen Arbeit steht. So konnte gezeigt werden, dass STAT3-Zielgene für grundlegende Eigenschaften eines Tumors wie Proliferationsverhalten, Invasion und Angiogenese verantwortlich sind und in vielen Krebsarten eine Erhöhung von phosphorylierten STAT3-Dimeren zu finden ist (Frank 2007).

2.3.2.3 Negativregulation der JAK/STAT-Signalkaskade

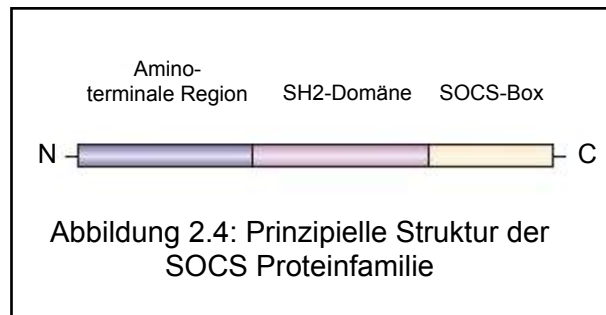
Da unter physiologischen Bedingungen die Konzentration an STAT3, selbst unter kontinuierlicher Stimulation mit Zytokinen, innerhalb einiger Stunden wieder abnimmt, stellt sich die Frage nach der Regulation dieses Prozesses. Es konnte gezeigt werden, dass es eine ganze Reihe an Rückkopplungsmechanismen gibt, die eine

dauerhafte STAT3-Aktivierung und damit eine maligne Transformation verhindern (Frank 2007).

Dazu gehört die Herabregulierung von Rezeptor/Ligand Komplexen durch deren Internalisierung, die Degradierung von Signalmolekülen wie STAT mit Hilfe von Proteasen, Inaktivierung von Positivfaktoren wie JAK mittels Dephosphorylierung, Inhibierung aktivierter STAT über Protein Inhibitoren aktivierter STAT (PIAS) sowie die Feedback-Hemmung von STAT via SOCS Expression, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll (Starr und Hilton 1999).

2.3.2.3.1 Feedback-Hemmung durch SOCS-Proteine

Die SOCS-Proteinfamilie besteht aus acht Mitgliedern, dem Zytokin induzierbaren Src-Homologieregion 2 (SH2) enthaltende Protein (CIS) und SOCS1 bis 7, die eine ähnliche Struktur aufweisen. So besitzen alle eine



zentrale Src-Homologieregion 2 (SH2-Domäne), welche die Bindung an phosphorylierte Tyrosinreste vermittelt sowie eine hoch konservierte Aminosäuresequenz an ihrem C-Terminus, die so genannte SOCS-Box. Verschiedene Sequenzmotive am N-terminalen Ende des Moleküls unterscheiden die einzelnen SOCS-Proteine voneinander.

Die SOCS-Proteine sind Teil einer klassischen Feedback-Hemmung des JAK/STAT Signaltransduktionsweges. Nach Zytokin-vermittelter STAT-Aktivierung stimulieren diese neben spezifischen Zielgenen auch die Transkription von SOCS Molekülen, die ihrerseits die Negativregulation über drei verschiedene Mechanismen vermitteln. So sind sie zum einen in der Lage mit Hilfe ihrer SH-2 Domäne an die Phosphotyrosin-Bindestellen des Rezeptors zu koppeln und auf diese Weise eine Anlagerung und Aktivierung von STAT zu verhindern. Eine weitere Möglichkeit der Suppression stellt die Inaktivierung von JAK dar. SOCS1 und SOCS3 verfügen hierfür über eine so genannte Kinase inhibierende Region (KIR-Domäne), mit der sie an das aktive Zentrum der JAK binden. Die KIR-Domäne dient dabei als Pseudosubstrat und verhindert somit die Phosphorylierung inaktiver STAT. Der dritte Mechanismus wird, nach Bindung von SOCS an den Rezeptor, über die SOCS-Box vermittelt. Sie

interagiert mit Elongin B und C, den Proteinen eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, die den Abbau von Rezeptor, JAK und SOCS über Proteasomen vermitteln. Damit scheinen SOCS eine direkte Inhibierung von Komponenten der JAK/STAT Signalkaskade mit einem allgemeinen Markierungsmechanismus für die Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradation zu verbinden (Alexander 2002).

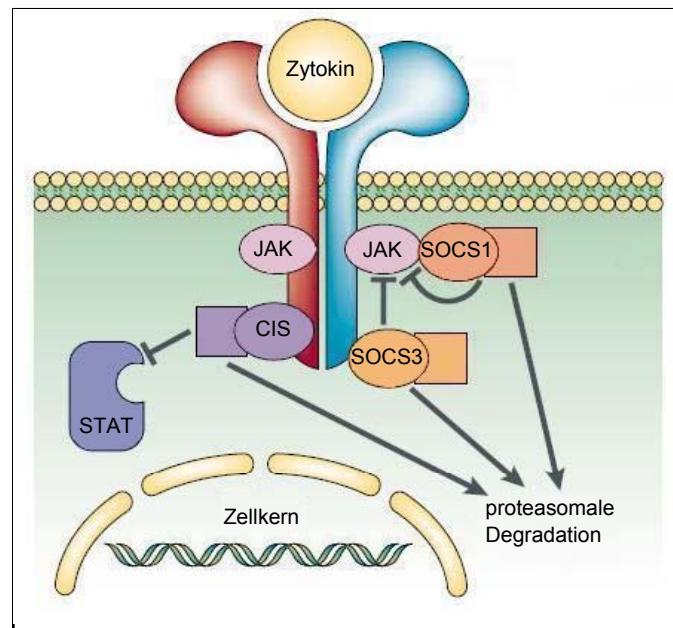


Abbildung 2.5: Mechanismen der Negativregulation durch SOCS

2.3.2.4 Die Relevanz von SOCS3 für Schwangerschaft und Krebsentstehung

Die wichtige Rolle die STAT3 in der Schwangerschaft sowie für das Tumorstadium spielt und die Tatsache, dass der SOCS3 Promotor ein STAT3-Bindeelement enthält, macht in diesem Zusammenhang eine Betrachtung von SOCS3 besonders interessant (Krebs und Hilton 2001).

So konnte tatsächlich ein Zusammenhang zwischen einer verminderten SOCS3-Expression und der Entstehung von Leberzelltumoren gezeigt werden (Niwa et al. 2005). Die Bedeutung von SOCS3 für eine erfolgreiche Schwangerschaft konnte wiederum im Maus-Modell bestätigt werden. So versterben SOCS3 defiziente „Knockout“-Mäuse schon in der frühen Schwangerschaft an den Folgen einer placentaren Insuffizienz (Boyle und Robb 2008).

Diese Ergebnisse legen eine essentielle Bedeutung von SOCS3 für die Schwangerschaft beim Menschen nahe, wobei schwangerschaftsassozierte Pathologien, wie Präeklampsie oder die Bildung eines Chorionkarzinoms, auf einer Fehlregulation von SOCS3 beruhen könnten.

Diese Erkenntnisse sollen die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden.

3. Ziele der Arbeit

3.1 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von SOCS3 auf JAR-Zellen, als Modellzelllinie für trophoblastäre Zellen. Hierzu soll zunächst mit Hilfe der RNA-Interferenz die Expression von SOCS3 herunterreguliert werden, dabei sollen sowohl ein stabiler „Knockdown“ mittels shRNA als auch ein transienter siRNA-„Knockdown“ zur Anwendung kommen. Anschließend werden die Auswirkungen auf das zelluläre Verhalten von JAR-Zellen untersucht. Dabei wird die Funktion von SOCS3 in unstimulierten bzw. mit dem Schwangerschafts-relevanten Zytokin LIF stimulierten Zellen hinsichtlich ihrer Proliferations-, Migrations- und Invasionsfähigkeit analysiert.

Die folgenden Arbeitshypothesen sollen mit Hilfe dieser Arbeit überprüft werden.

3.2 Arbeitshypothesen

1. Mittels RNAi kann eine effektive Reduktion der SOCS3-Expression erfolgen.
2. In SOCS3-„Knockdown“-Zellen zeigt sich aufgrund der verminderten Feedback-Hemmung ein erhöhtes Level an aktiviertem (phosphoryliertem) STAT3.
3. Der SOCS3-„Knockdown“ in JAR-Zellen führt hierdurch zu einem Einfluss auf STAT3-vermittelte Zellfunktionen, dieser Einfluss lässt sich durch das STAT3 aktivierende Protein LIF verstärken.

4. Methodik

4.1 Zellkultur

4.1.1 JAR-Zelllinie

1971 isolierte R.A. Patillo diese humane Corionkarzinomzelllinie aus der Plazenta einer 24jährigen kaukasischen Patientin mit einem Trophoblasttumor. Ausgehend vom Ursprungsgewebe existieren heute 722 Subkulturen. JAR-Zellen wachsen in vitro als Monolayer mit epitheloider Morphologie und können Östrogen, Progesteron, Gonadotropin und Lactogen produzieren. (Vgl. American Type Culture Collection, 2008).

4.1.2 SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie

Die SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie wurde von Tobias Pöhlmann am Plazenta-Labor der FSU Jena hergestellt. Es handelt sich dabei um JAR-Zellen, die mit einem pSUPER.retro.neo+GFP-Vektor transfiziert wurden, der für SOCS3-short hairpin RNA (shRNA) kodierende Inserts enthält. Die Zellen produzieren daher kontinuierlich SOCS3-shRNA, die intrazellulär zu small interfering RNA (siRNA) umgewandelt wird. Diese siRNA-Oligonukleotide vermitteln die so genannte RNA-Interferenz auf die in Kapitel 4.2 näher eingegangen wird und die zu einer dauerhaften Verminderung der SOCS3-Expression führt.

4.1.3 Kultivierung der Zelllinien

Die JAR-Zellen werden als Monolayer in 50 ml Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, humide Atmosphäre) kultiviert. Als Nährmedium dient Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 2% antibiotisch-antimykotischer Lösung (AAS) versetzt wurde. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit ist es nötig die Zellen alle 3-5 Tage in Einzelzellsuspension zu überführen, um sie auf neue Kulturflaschen zu verteilen, zu Versuchen heranzuziehen oder zur Lagerung einzufrieren.

Zu diesem Zwecke wird das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und durch 5 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) ersetzt. Dann werden die Zellen nach Zugabe von 1 ml Trypsin für 5 min bei Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen die sich nun vom Boden der Kulturflasche gelöst haben, können jetzt zu Versuchen gebraucht oder weiterkultiviert werden.

4.2 RNA-Interferenz

4.2.1 Hintergrund

Die RNA-Interferenz ist eine evolutionär konservierter Mechanismus, der Zellen zur Abwehr von Viren mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) dient und in der modernen Molekularbiologie sowohl in vivo als auch in vitro Anwendung zur funktionellen Genanalyse findet.

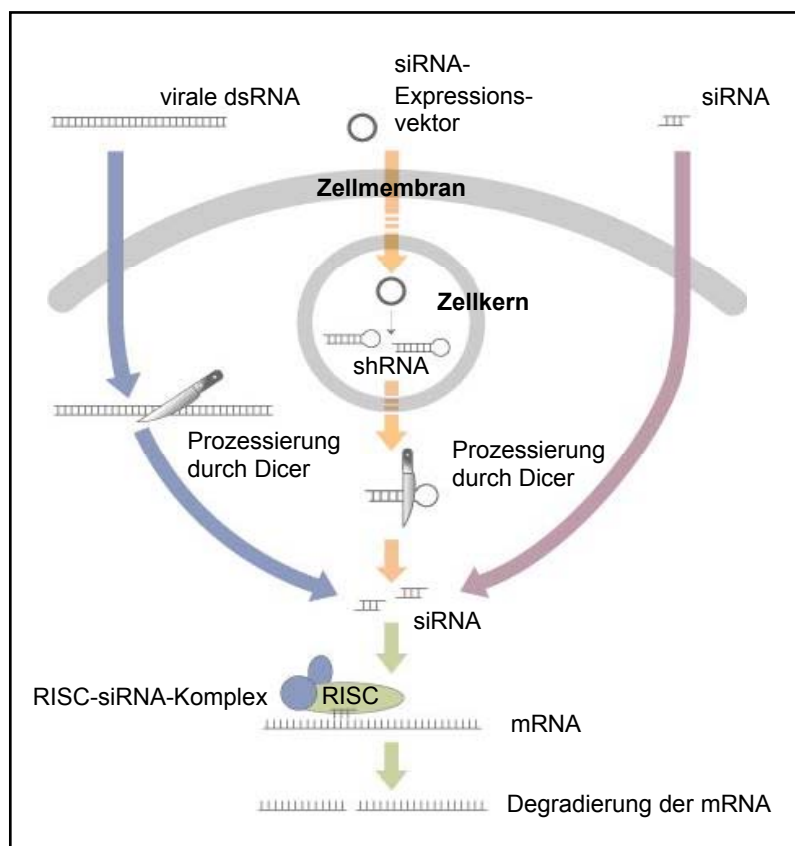


Abbildung 4.1: Drei Möglichkeiten, den RNAi-Mechanismus auszulösen

Dieser posttranskriptionelle Mechanismus der Genregulation macht sich zu Nutze, dass Messenger RNA (mRNA) mit Hilfe von komplementärer dsRNA degradiert werden kann. In experimenteller Hinsicht unterscheidet man zwischen siRNA und shRNA. Bei der siRNA handelt es sich um 19-25 Basenpaar lange RNA-Duplexe, die nach Einschleusen in die Zelle von einem als RNA-induced silencing complex (RISC) bezeichneten Multienzymkomplex aufgenommen werden. Hier wird der sense-Strang nach Aufwindung der dsRNA durch eine Helikase abgebaut, während der antisense-Strang im RISC-Molekül gebunden bleibt. Dieser kann nun mit komplementären sich im Zytosol befindlichen mRNAs hybridisieren, welche anschließend von den Enzymen des RISC-Komplexes degradiert werden. Hierdurch kann die Translation zum entsprechenden Zielprotein gehemmt und damit dessen Konzentration effektiv reduziert werden. Da dieser Effekt in Abhängigkeit des Proliferationsstatus' der Zelle nur eine kurze Zeit anhält, werden um einen länger anhaltenden „Knockdown“ zu erreichen Vektor-basierende Methoden verwendet. Die in die Zellen eingeschleusten Vektoren kodieren für spezifische shRNAs, die von den entsprechenden Polymerasen gebildet werden. Diese shRNAs werden dann von den RNAsen Dicer und Drosha prozessiert und so in siRNAs mit den oben beschriebenen Eigenschaften und Wirkungen umgewandelt. Werden die Vektoren bei jeder Zellteilung repliziert oder in das Wirtsgenom eingebaut, so sind die shRNA-vermittelten „Knockdown“-Effekte stabil. (Hannon 2002).

4.2.2 „Knockdown“ mittels siRNA

4.2.2.1 Annealing der siRNA

Vor der Transfektion der Zellen mit siRNA müssen die als einzelsträngig vorliegenden sense und antisense Oligonukleotide steril zu dsRNA hybridisiert werden. Hierzu löst man die Oligonukleotide in Nuklease-freiem Wasser, sodass sie in einer Konzentration von 100 µM vorliegen. Für die Hybridisierung werden zunächst jeweils 20 µl der gelösten Nukleotide mit 5 x siRNA Annealing Puffer und Nuklease-freiem Wasser zu einer Endkonzentration von 10 µM versetzt. Diese Ansätze werden 1 min bei 90°C und anschließend 60 min bei 37°C inkubiert. Die so entstandene siRNA kann nun zu Versuchen gebraucht oder bei -20°C gelagert werden.

4.2.2.2 Transfektion der Zellen

Das Einschleusen der siRNA in die Zellen erfolgt mittels liposomaler Transfektion. Hierbei bildet das Transfektionsreagenz Liposomen, die die siRNA einschließen und von den Zellen per Endozytose aufgenommen werden.

Die zu transfizierenden Zellen werden am Vortag der Transfektion abtrypsiniert und in, mit 10% FKS sowie 2% AAS versetztem, DMEM suspendiert. Auf 6-Well-Platten werden die Zellen nun so ausgesät, dass sie nach 24 h ca. 30-40% konfluent sind. Unter sterilen Bedingungen erfolgt nun die Transfektion mit OligofectamineTM. Hierzu präpariert man zunächst den Transfektionsansatz. Dabei mischt man 175 µl serumfreies Optimem-Mangelmedium mit 10 µl der 10 µM siRNA. In einem zweiten Ansatz werden 4 µl OligofectamineTM-Reagenz mit 11 µl Optimem gemixt. Diese beiden Ansätze werden anschließend vereinigt, gut gemischt und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Währenddessen wird das Medium der adhärennten Zellen durch 800 µl serumfreies Optimem ersetzt. Nach Ablauf der 20 min Inkubationszeit gibt man den Transfektionsansatz, welcher siRNA in einer Endkonzentration von 100 nM enthält, zu den Zellen und inkubiert 4 h bei 37 °C und 5% CO₂. Die Transfektion wird durch Zugabe von 500 µl DMEM, welches 30 % FKS, aber kein Antibiotikum enthält, gestoppt. Anschließend werden die Zellen bei oben genannten Bedingungen für 24 h weiterkultiviert, bevor der Erfolg mittels Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot kontrolliert wird bzw. die Zellen zu weiteren Experimenten verwendet werden.

Um einen Effekt der Transfektionsreaktion von der spezifischen Wirkung der siRNA zu differenzieren, wurde jedem „Knockdown“ mit siRNA eine Kontrolle gegenübergestellt, in der dieselben Nukleotide in nicht-genomischer Reihenfolge angeordnet waren.

4.3 Lysieren der Zellen zur Proteinisolation

Zum Lysieren der Zellen wird zunächst das Medium aus den 6-Well-Platten entfernt und durch PBS ersetzt, welches zusätzlich einen Proteinaseinhibitor (PI) enthält. Im Anschluss werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst, in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 5°C mit 2500 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgt ein erneutes Waschen der Zellen mit PBS+PI und nachfolgender Zentrifugation. Danach wird den Zellen 75 µl Zell-Lyse-Puffer zugegeben und es folgt die Lyse durch mehrmaliges abwechselndes Einfrieren, Auftauen und Vortexen. Abschließend erfolgt eine letzte Zentrifugation für 30 min bei 5°C und 18000 rpm, bevor die Proteinkonzentration im Überstand ermittelt wird.

4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine in den Zelllysaten wird mit der Bradford-Methode ermittelt. Dazu werden je 5 µl des Überstandes mit 1ml Bradfordlösung versetzt, um nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss die Absorbtion bei 595 nm zu messen. Parallel wird, unter gleichen Bedingungen, die Absorbtion einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin bekannter Konzentrationen bestimmt, um aus der so ermittelten Standardkurve auf die Konzentration der Proben Rückschließen zu können.

4.5 SDS-PAGE und Western Blot

4.5.1 Hintergrund

Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich denaturierte Proteine (hier aus lysierten Zellen) zunächst elektrophoretisch in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes auftrennen, um dann im Western Blot durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran transferiert zu werden. Die Immundetektion erfolgt mit Primär- und Sekundärantikörpern, die mittels Chemilumineszenz auf einem lichtempfindlichen Film sichtbar gemacht werden können.

4.5.2 Durchführung

Für die SDS-PAGE werden je 20 µg denaturiertes Protein auf ein 12% Acrylamid (AA)-Gel aufgetragen. Es folgt die elektrophoretische Auftrennung der Proteine innerhalb von 2 bis 3 h bei 120V. Bei einer Stromstärke von 250 mA werden die Proteine anschließend in ca. 10 min auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Kontrolle erfolgt die unspezifische Anfärbung der Proteine mit Ponceau S auf der Membran, die danach mit 0,8%iger NaOH-Lösung wieder entfärbt wird. Daraufhin wird die Membran für 12 h bei Raumtemperatur mit NET-G-Puffer inkubiert, um später unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Über Nacht erfolgt anschließend die Inkubation bei 4°C mit dem 1:1000 verdünnten, unmarkierten primären Antikörper, der spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet. Danach wird die Membran 5 x 5 min mit NET-G gewaschen, bevor mit 1:10 000 verdünntem sekundären Horse-radish Peroxidase (HRP)-konjugiertem Antikörper bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert werden kann. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den zuvor verwendeten primären Antikörper. Nachdem die Membran erneut 5 x 5 min mit NET-G gewaschen wurde, erfolgt die Zugabe von 1 ml HRP-Substrat-Lösung auf die Membran und eine Inkubation für etwa 1 min im Dunkeln. Das entstehende Chemilumineszenzsignal kann nun mit Hilfe eines lichtempfindlichen Photofilms detektiert werden.

4.6 Bestimmung der Genexpression

4.6.1. Hintergrund

Der Nachweis der Transkription, als wichtigen Schritt der Genexpression, wird mit Hilfe der mRNA erbracht. Diese kann aus den Zellen isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RTS) in komplementäre DNA Einzelstränge (cDNA) umgeschrieben werden. Dies ist von Bedeutung, da bei der nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bzw. real time PCR (rtPCR) nur DNA von der Taq-Polymerase als Matrize erkannt und amplifiziert werden kann. Die rtPCR erlaubt im Gegensatz zur PCR einen quantitativen Rückschluss auf die zugrunde liegende Konzentration der spezifischen cDNA und damit auf die Expression von mRNA. Bis auf die Isolierung der RNA erfolgten alle Experimente zur Bestimmung der Genexpression in Zusammenarbeit mit Dr. Jianqiang Wu am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie.

4.6.2 RNA-Isolierung

Für den Versuch wurden JAR-Zellen auf drei 6-Well-Platten verteilt, wobei eine Platte mit SOCS3-siRNA und eine Platte mit einer nicht-genomischen Kontrolle transfiziert wurden, während man die dritte Platte mit nativen JAR-Zellen beließ. Zusätzlich wurde eine 6-Well-Platte mit der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie beimpft. Am Folgetag ließ man die Zellen für 1 h in Optimem-Medium hungern, um im Anschluss der Hälfte der Zellen 10ng LIF zuzugeben. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml wurden die Zellen für 1 h im Brutschrank inkubiert. Für die anschließende Isolierung der Gesamt-RNA unter Verwendung des „Mini RNA Isolation II KitTM“ von Zymo Research, standen nun jeweils stimulierte und unstimulierte Triplikate der Negativkontrolle, der mit nicht-genomischer siRNA transfizierten Kontrolle, des siRNA- sowie des shRNA-„Knockdowns“ zur Verfügung. Zur Isolierung wurden die Zellen in den Wells zunächst mit 600 µl Zymo Research RNA-Puffer lysiert und dann mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Diese Suspension wurde auf eine sich in einem Sammeltube befindliche Zymo-SpinTM Säule übertragen und für 1 min bei 10 000 rpm abzentri-

fugiert. Es folgten zwei Waschschriffe, in denen jeweils 350 µl RNA-Wasch-Puffer auf die Säule gegeben und anschließend bei 10 000 rpm für 1 min abzentrifugiert wurde. Zur Elution der RNA wurde nun 50 µl RNase- und DNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben und nach 2 min in RNase-freie Tubes abzentrifugiert. Die isolierte RNA kann sofort benutzt oder bei -70°C gelagert werden.

4.6.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und –Gelelektrophorese

Die Messung der RNA-Konzentrationen erfolgte mit dem Spektrophotometer „NanoDrop“, welches aufgrund der Absorptionsfähigkeit der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen bei 260 nm die Konzentration bestimmt. Neben der errechneten RNA-Konzentration wurde ebenfalls die Reinheit der RNA überprüft. Dazu dient der als Reinheitsfaktor benannte Quotient aus Absorption bei 260 nm und Absorption bei 280 nm, der bei einer kontaminationsfreien Lösung zwischen 1,7 und 2,1 betragen sollte.

Bevor die Integrität der RNA mit Hilfe einer Auftrennung der Moleküle in einem 1% Agarose-Gel überprüft wurde, erfolgte eine Verdünnung aller Proben auf eine Konzentration von 0,2 µg/µl mit RNase-freiem Wasser. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1 x TAE Puffer durch Erwärmung in einer Mikrowelle gelöst und nach Zugabe von 20 µg Ethidiumbromid pro 100 ml in die Gelkammer gegossen. Während das Agarose-Gel polymerisierte, wurden 1 µl jeder Probe mit 5 µl Auftragspuffer gemischt und bei 60°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und es erfolgte die Auftrennung der RNA nach ihrem Molekulargewicht für ca. 30 min bei 100V. Das dem Gel beigemischte Ethidiumbromid ist ein mit Nukleinsäuren interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der es ermöglicht die RNA-Banden auf dem Gel unter UV-Licht-Einstrahlung direkt sichtbar zu machen. Bei intakter RNA sind hier die beiden Banden der 18S- und 28S-RNA deutlich voneinander abgrenzbar, während ein verschmiertes Erscheinungsbild auf stattgefundene Degradierung hinweist.

4.6.4 Reverse Transkription

4.6.4.1 Hintergrund

Da mRNA bei der PCR nicht erkannt und vervielfältigt werden kann, ist es notwendig sie zuvor in DNA umzuschreiben. Hierzu wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase eine komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) zur mRNA erstellt, die wie diese keine Intron-Sequenzen enthält und nun der Taq-Polymerase als Matrize zur Vervielfältigung dient.

Zur Initiation der reversen Transkription (RT) werden Oligo(dt)Primer verwendet, die spezifisch an den poly(A)-Schwanz der mRNAs binden. An deren vorliegendem 3' Ende beginnt nun die RTS mit der Synthese eines komplementären DNA-Stranges in 5'-3' Richtung. Als Bausteine für die neu entstehenden Nukleinsäuren dienen Desoxy-Nukleosid-Triphosphate (dNTPs), deren Abfolge durch die Sequenz der RNA bestimmt wird. Durch anschließendes Erhitzen der Proben wird eine Denaturierung des Enzyms erreicht und die Reaktion beendet.

4.6.4.2 Durchführung

Die RT wurde ebenso wie die PC-Reaktionen in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt. Dazu wurden 5 µl jeder RNA-Probe (0,2 µg/µl s.o.) mit 3 µl DEPC-Wasser sowie jeweils 0,5 µl dNTP und Oligo(dt) gemischt und anschließend, um Sekundärstrukturen zu vermeiden, für 5 min bei 65°C erhitzt. Nachdem die Proben 1 min auf Eis abgekühlt wurden, gibt man nun 2 µl 5 x RT-Puffer, 1 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 2 µl 25 mM MgCl₂, 0,25 µl RNaseOUT™ RNase Inhibitor und 0,075 µl SuperScript II Reverse Transkriptase hinzu. Nach vorsichtigem Mischen wurde die RT-Reaktion für 1 h bei 42°C durchgeführt. Anschließend folgte ein 15-minütiges Erhitzen auf 70°C, um die RTS zu inaktivieren, bevor nach Abkühlung auf 15°C jeder Probe abschließend 15 µl Mili-Q-Wasser zugegeben wurden.

Ein Abbau der RNA aus dem entstandenen RNA/DNA-Hybrid mit RNase H ist in diesem Fall nicht nötig. Da die cDNA nur für PCR verwendet wird, dissoziiert sie dort im ersten Denaturierungsschritt bei 95°C von der RNA, welche durch die hohe Temperatur alsbald degradiert wird.

4.6.5 PCR

4.6.5.1 Hintergrund

In der PCR wird die bei der RT gebildete cDNA unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Die cDNA dient dabei als Matrize für die Herstellung neuer komplementärer DNA-Stränge durch DNA-Polymerasen. Aufgrund ihrer Hitzebeständigkeit verwendet man hier die Taq-Polymerase, die vom thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und während der Zyklen nicht zerstört wird.

Der 3-stufige PCR-Prozess beginnt mit einer Denaturierung der DNA bei 94°C, hier werden komplementäre Stränge getrennt. Beim ersten Zyklus dauert diese Phase länger um sicher zu stellen, dass Ausgangs-DNA und Primer vollständig getrennt voneinander vorliegen. Anschließend erfolgt das Abkühlen des Reaktionsansatzes auf die so genannte Annealing-Temperatur von 56°C, bei der die Primer mit der einzelsträngig vorliegenden DNA hybridisieren. Anschließend ergänzt die Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C und in Anwesenheit von MgCl₂ die Primer in 5'-3' Richtung zu komplementären Strängen. Durch 25-40-faches Wiederholen dieses Zyklus wird der gewünschte DNA-Abschnitt amplifiziert, wobei in den Folgezyklen auch die neu gebildeten Stränge der DNA-Polymerase als Matrize dienen. Auf diese Weise wird ein exponentielles Anwachsen der PCR-Produkte erreicht, die im Anschluss mit Hilfe einer Gelelektrophorese identifiziert werden können.

Um eine relative Quantifizierung des Transkriptionsproduktes vornehmen zu können, wird von jeder Probe eine PCR mit einem weitgehend von äußeren Faktoren unabhängig exprimierten Haushalts-Gen durchgeführt. Diese „Housekeeping-Genes“ (hier: β -Actin) kodieren für Proteine, die für die Aufrechterhaltung grundlegender Stoffwechselfunktionen von Bedeutung sind.

4.6.5.2 Durchführung

Zunächst erfolgte die Herstellung eines Mastermix, der zu je 19 μ l in sterile 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße aliquotiert und dann mit je 1 μ l cDNA versetzt wurde (Tab.4.1). Die beim Amplifikationsprozess im Thermocycler vorherrschenden Bedingungen sind in Tabelle 4.2 schematisch dargestellt.

Tab.4.1: PCR-Mastermix

Reagenz	Menge in μl
10xReaktionspuffer	2
MgCl ₂	1,6
dNTP	0,4
Primer Forward (10 μM)	0,4
Primer Reverse (10 μM)	0,4
Taq-Polymerase	0,4
ddH ₂ O	14,2
Template	1

Tab.4.2: PCR-Temperatur-Profil

	initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Extension	terminale Extension
Temp.	94°C	94°C	56°C	72°C	72°C
Zeit	1 min	10 s	30 s	25 s	5 min
Anzahl der Zyklen	1	40			1

Zur Identifizierung der PCR-Produkte wurde im Anschluss an die Amplifikation jeweils 15 μl jeder Probe 4 μl Auftragspuffer zugegeben und auf ein 1,6%iges TAE-Gel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V für ca. 30 min wanderten die PCR-Produkte in Abhängigkeit von Ihrer Molekulargröße in Richtung Anode und konnten durch das dem Gel beigefügte Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Bei der Auswertung mit Hilfe des GeneGenius Gel Imaging Systems und der GeneSnap Software durfte folglich nur die Bande für das amplifizierte Gen, dessen Größenordnung mit Hilfe eines mitgeführten DNA-Längenstandards (100 Basenpaar (bp) DNA-Leiter) vorgenommen wurde, zu sehen sein.

4.6.6 Real-Time PCR

4.6.6.1 Hintergrund

Die Real-Time PCR ist eine Methode, mit der sich aus mRNA gewonnene cDNA quantitativ bestimmen lässt und somit auf die Expressionshöhe von Genen zurück geschlossen werden kann. Grundsätzlich ist ihr Prinzip mit dem der herkömmlichen PCR vergleichbar. Der Unterschied besteht darin, dass sich die Amplifikate nicht erst am Ende der Reaktion mittels Gelelektrophorese, sondern bereits während des PCR-Verlaufs über Fluoreszenz detektieren und quantifizieren lassen. In der exponentiellen Phase der rtPCR korreliert dieses Signal direkt mit der Menge des Amplifikates und wird nach jedem Reaktionszyklus gemessen. Somit kann die Entstehung der PCR-Produkte quasi in „Echtzeit“ verfolgt werden. Das Fluoreszenzsignal kann entweder mittels DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe oder mit Hilfe fluorophormarkierter Oligonukleotide als Sonden erzeugt werden. Der für die hier durchgeführte rtPCR eingesetzte Cyanin-Farbstoff SYBR[®] Green bindet in doppelsträngiger DNA und fluoresziert nach Anregung mit einer Leuchtdiode stärker als der freie Farbstoff. Da aufgrund seiner geringen Spezifität jedoch auch unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere detektiert werden, überprüft man die Produktspezifität anschließend mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse. Dabei erfolgt durch kontinuierliche Temperaturerhöhung bis auf 95°C ein Aufschmelzen der DNA-Stränge, bei der der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green freigesetzt wird. Dies kann in Form einer Abnahme des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Da unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere meist einen geringeren Schmelzpunkt als die spezifischen Amplifikate des Zielgens besitzen, weisen ein oder mehrere zusätzliche Peaks in der Schmelzkurve, meist bei niedriger Temperatur, auf deren Vorhandensein hin.

Auch bei der rtPCR wird, zur relativen Quantifizierung des spezifischen Transkriptionsproduktes, jeder Probe eine Amplifikation mit einem Haushalts Gen (β -Actin) gegenübergestellt.

4.6.6.2 Durchführung

Sowohl für das Gen dessen Expression mit Hilfe der rtPCR quantifiziert werden soll (hier: SOCS3) als auch für das entsprechende Haushalts-Gen wurde ein Master Mix in sterilen 1,5 ml Tubes vorbereitet. (Tab.4.3)

Tab.4.3: rtPCR-Master Mix

Reagenz	Menge in μ l
10 x Reaktionspuffer	2
50 mM $MgCl_2$	1,4
5 mM dNTP	0,8
5 μ M Primer Forward	1,2
5 μ M Primer Reverse	1,2
SYBR [®] Green	0,6
ddH ₂ O	14,7
Hotgoldstar DNA-Polymerase	0,1
Template (100ng)	1

Jeweils 19 μ l jedes Master Mix wurden zunächst steril in die Tubes einer PCR-Mikrotiterplatte aliquotiert und anschließend mit 1 μ l cDNA versetzt. Die während des Amplifikationsprozesses im Cyclyer vorherrschenden Bedingungen sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tab.4.4: rtPCR-Temperatur-Profil

	initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Extension	terminale Extension und Aufschmelzen
Temp.	95°C	95°C	60°C	60°C – 95°C
Zeit	10 min	15 s	1 min	20 min
Anzahl der Zyklen	1	45		1

4.6.6.3 Auswertung

Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes erfolgt auf Basis des so genannten threshold cycle (Ct-Wert). Dieser benennt den Zyklus, an dem die spezifische Fluoreszenz des Amplifikates die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Da dieser sich am Beginn der exponentiellen Phase der PCR befindet, besteht zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge cDNA (mRNA) und dem Ct-Wert eine umgekehrt proportionale Beziehung. Somit kann mit Hilfe einer cDNA-Verdünnungsreihe eine Standardkurve konstruiert werden, mit welcher mittels Ct-Wert für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden kann. Um die errechnete Kopienzahl relativ zu quantifizieren, wird ein nicht-reguliertes Referenzgen als interne Kontrolle benötigt, mit der die Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA ausgeglichen werden können. Diese so genannte Normalisierung der Expressionsergebnisse erfolgt, indem man den Quotient aus der errechneten Kopienzahl des Zielgens und der Anzahl der Kopien der internen Kontrolle bildet. (Pfaffl 2004)

$$\text{Expression Zielgen (normalisiert)} = \frac{\text{Kopienzahl Target}}{\text{Kopienzahl Referenz}}$$

4.7 Funktionelle Tests

4.7.1 Hintergrund

Nach dem „Knockdown“ spezifischer Proteine mittels siRNA soll mit Hilfe von funktionellen Tests deren Einfluss auf verschiedene zelluläre Funktionen überprüft werden. Dazu vergleicht man transfizierte Zellen mit nicht-transfizierten Kontrollen. Da auch Zytokine regulierenden Einfluss auf die zu untersuchenden zellulären Funktionen ausüben können, stellt man unstimulierten Zellen mit Zytokinen versetzte Kontrollen gegenüber. Je nach verwendetem Zytokin können 24 bis 48 h nach der Zugabe zum Zellkultivierungs-Medium funktionelle Tests erfolgen.

4.7.2 Proliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten bestimmter Zellen zu untersuchen, werden diese zunächst abtrypsinisiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Eine festgelegte Zahl dieser Zellen wird in 700 µl DMEM (je nach Untersuchung mit oder ohne FKS) resuspendiert, auf einer 24-Well-Platte ausgesät und gegebenenfalls mit Zytokinen stimuliert. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ werden die Zellen abtrypsinisiert, in ein Proberöhrchen überführt und anschließend mit Hilfe eines Durchflusszytometers gezählt.

4.7.3 Migrationsassay

Das Migrationsverhalten von Zellen wird bestimmt, indem man erneut eine definierte Anzahl an Zellen in 700 µl DMEM resuspendiert und in so genannte Inserts sät. Diese werden wiederum in eine 24-Well-Platte eingebracht. Anschließend findet gegebenenfalls eine Stimulation mit Zytokinen statt.

Am Boden der Inserts befinden sich Poren definierter Größe, die eine Migration der Zellen in die Vertiefung der 24-Well-Platte erlauben. Nachdem für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurde, entfernt man die Inserts aus der Platte. Die Zellen die sich jetzt in den Wells befinden, müssen folglich durch den Boden der Inserts migriert sein

und können abtrypsiniert und in Proberöhrchen überführt werden. Abschließend wird mittels Durchflusszytometrie deren Anzahl bestimmt.

4.7.4 Invasionsassay

Um beurteilen zu können wie invasiv Zellen wachsen, wird ein Versuchsaufbau gewählt, der analog dem des Migrationsassays ist. Im Unterschied zu diesem muss der Boden der Inserts jedoch mit einem Matrigel beschichtet werden. Hierzu verwendet man 50 µl MatrigelTM-Lösung, die mit serumfreiem DMEM 1:10 verdünnt wird. Die Inserts werden anschließend bei Raumtemperatur für 4 h inkubiert. In dieser Zeit geliert das Matrigel und simuliert für die Zellen eine Barriere, die der extrazellulären Matrix in vivo entspricht. Sind Zellen zu invasivem Verhalten befähigt, so können sie die Gel-Schicht verdauen und in die Wells der sich darunter befindlichen Platte einwandern. Dort werden sie gesammelt und anschließend mittels Durchflusszytometer ausgezählt.

4.8 Durchflusszytometrie

4.8.1 Hintergrund

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das unter anderem bei der Zählung von Zellen in einer Suspension Verwendung findet. Hierbei werden die durch eine Kapillare angesaugten Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei wird ein Teil des Lichtes gestreut, was im Gerät mittels Photomultipliern detektiert wird. Da die Zellen einzeln am Laser vorbeigeleitet werden, kann anhand der Anzahl der detektierten Signale die Zellzahl ermittelt werden. Mit Hilfe des Streulichtes können aber auch andere Parameter wie Größe und Granularität der Zellen bestimmt werden, was zur Unterscheidung verschiedener Populationen bzw. Partikel dient. Hierbei erlaubt das so genannte Vorwärtstreulicht (forward scatter) Rückschlüsse auf die Größe der Zellen, während die Menge des Seitwärtstreulichtes (sideward

scatter) von der Form und Größe des Zellkerns sowie der Granularität der Zellen abhängig ist.

4.8.2 Durchführung

Für die Zellzählung mittels Durchflusszytometer wurde die Software Cell Quest Pro verwendet. Da bei jeder Messung nur ein kleiner Teil des Suspensionsvolumens verwendet wird, mischt man jedem Ansatz zuvor eine definierte Menge in PBS suspendierter Polysterolkügelchen bei. Mit Hilfe dieser so genannten Beads können Rückschlüsse auf die Gesamtzellzahl der Suspension gezogen werden. Während der Messung werden sie parallel zu den Zellen ausgezählt und können aufgrund der unterschiedlichen Größe von ihnen unterschieden werden. Die Berechnung der Gesamtanzahl der in der Suspension vorliegenden Zellen, mit Hilfe der gemessenen Zellen und Beads, erfolgt anschließend mit folgender Formel:

$$\text{Zellen}_{\text{gesamt}} = \frac{\text{Zellen}_{\text{gezählt}} \times \text{Beads}_{\text{gesamt}}}{\text{Beads}_{\text{gezählt}}}$$

4.9. Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel™ durchgeführt. Für die Ergebnisse von wiederholten Experimenten wurden dabei Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler berechnet. Aussagen über die Signifikanzen für gepaarte Proben konnten darüber hinaus mit Hilfe des Student's t-Tests getroffen werden, wobei eine Signifikanz dann vorliegt, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 ist.

5. Ergebnisse

5.1 Nachweis des RNAi vermittelten SOCS3-„Knockdowns“

Der Nachweis eines funktionierenden „Knockdowns“ ist für die funktionellen Tests von grundlegender Bedeutung. Um diesen Nachweis zu führen, wurde zum einen die Genexpression von SOCS3 in siRNA-transfizierten JAR-Zellen sowie in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie mittels PCR und rtPCR untersucht. Des Weiteren wurden die Proteinkonzentrationen von SOCS3 nach erfolgtem „Knockdown“ mittels Western Blot bestimmt.

5.1.1 Genexpression von SOCS3 nach „Knockdown“ mit siRNA und shRNA

Die Genexpression von SOCS3 wurde sowohl in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie als auch in siRNA-transfizierten JAR-Zellen im unstimulierten Zustand und nach Zugabe von 10 ng/ml LIF für 1 h untersucht. Die Transfektion der JAR-Zellen mit SOCS3-siRNA erfolgte dabei für 24 h wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Dem wurden zwei Kontrollen gegenübergestellt, eine Negativkontrolle mit nicht transfizierten JAR-Zellen und eine Kontrolltransfektion mit nicht-genomisch angeordneter siRNA, welche ebenfalls jeweils einmal mit LIF stimuliert wurden und einmal unstimuliert blieben.

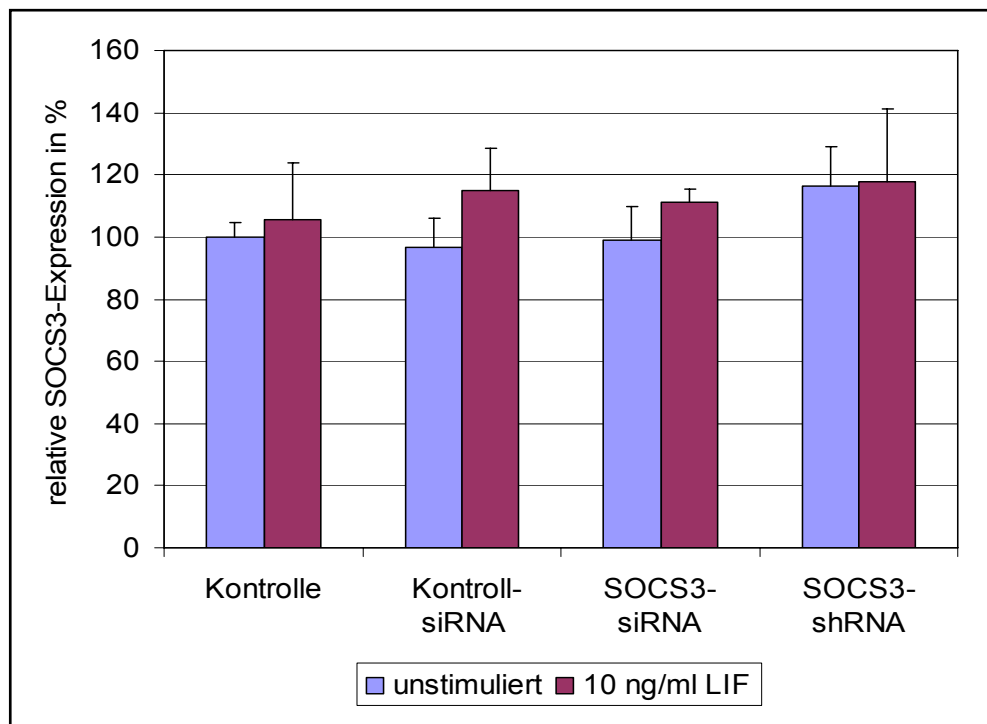


Abbildung 5.1: PCR ermittelte SOCS3-Expression in JAR-Zellen mit und ohne LIF-Stimulation.

Dargestellt ist die relative SOCS3-Expression siRNA- oder shRNA-transfizierter JAR-Zellen im Vergleich zu einer nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer nativen Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte dabei mit Hilfe des mitgeführten Referenzproteins β -Actin [MW+STABW; t-Test: * $p < 0,05$, $n=3$].

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse zeigte, dass durch Transfektion mit SOCS3-siRNA keine signifikante Verminderung der Genexpression im Vergleich zur nicht-genomischen Kontroll-siRNA bzw. zur Kontrolle zu verzeichnen ist. Ebenso wenig erfolgte eine Herunterregulation von SOCS3 in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie, vielmehr wiesen diese eine erhöhte Expression von 116% im Vergleich zur nativen Kontrolle auf, die sich jedoch als nicht signifikant herausstellte ($p=0,08$). Nach Stimulierung mit LIF zeigte sich jeweils eine Erhöhung der SOCS3-Expression, die jedoch in keinem der Fälle eine Signifikanz aufwies [Abb. 5.1].

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass die PCR ein semiquantitatives Verfahren zur Untersuchung der Genexpression darstellt, erfolgte eine Quantitative Bestimmung von SOCS3 mRNA mit Hilfe der rtPCR.

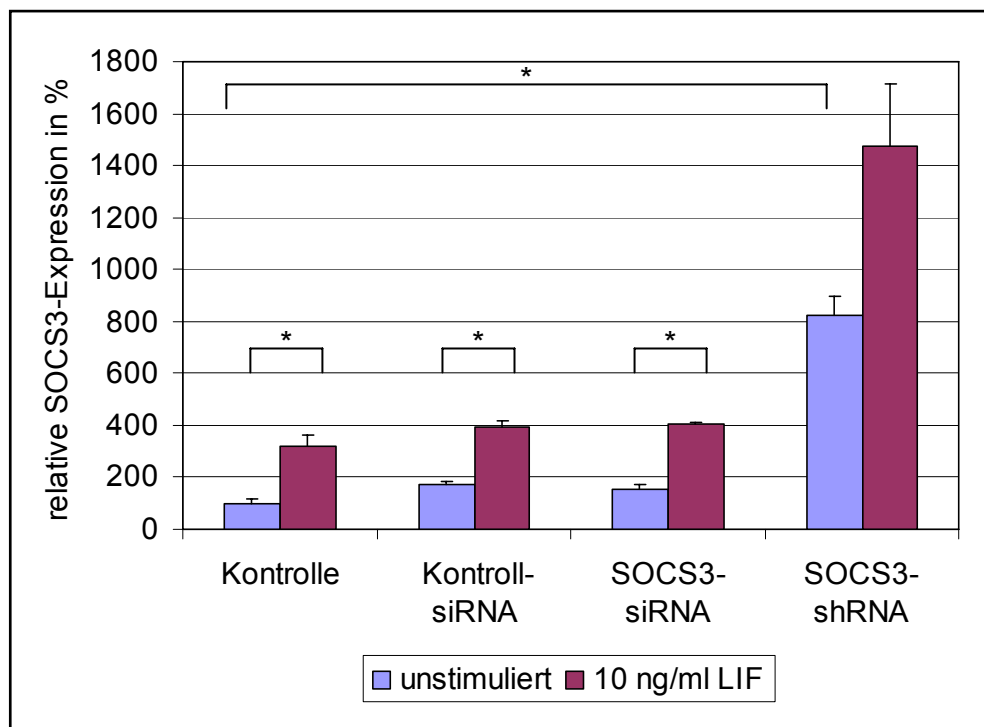


Abbildung 5.2: rtPCR ermittelte SOCS3-Expression in JAR-Zellen mit und ohne LIF-Stimulation.

Dargestellt ist die relative SOCS3-Expression siRNA- oder shRNA-transfizierter JAR-Zellen im Vergleich zu einer nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer nativen Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte dabei mit Hilfe des mitgeführten Referenzproteins β -Actin [MW+STABW; t-Test: * $p < 0,05$, $n = 3$].

In der rtPCR bestätigte sich, dass eine Transfektion mit SOCS3-siRNA, im Vergleich zur nativen Kontrolle, zu keiner Verminderung der SOCS3-Genexpression führt, sondern mit einer Erhöhung auf ca. 150% in etwa der der nicht-genomisch transfizierten Kontrolle entspricht. Im Vergleich zu den Ergebnissen der PCR zeigte sich in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie jedoch eine signifikante Erhöhung der Transkription von SOCS3 um 700% im Vergleich zur nativen Kontrolle. Auch konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit LIF in allen Versuchen zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von SOCS3 auf das 2-3 fache führt, die sich nur im Fall der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie als nicht signifikant erwies ($p = 0,06$) [Abb. 5.2].

5.1.2 Nachweis des Protein-„Knockdown“ in siRNA- und shRNA-transfizierten JAR-Zellen

Der Nachweis des SOCS3-„Knockdowns“ in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Dabei wurde das SOCS3-Proteinlevel der stabil transfizierten Zellen dem einer untransfizierten Kontrolle nativer JAR-Zellen gegenübergestellt.

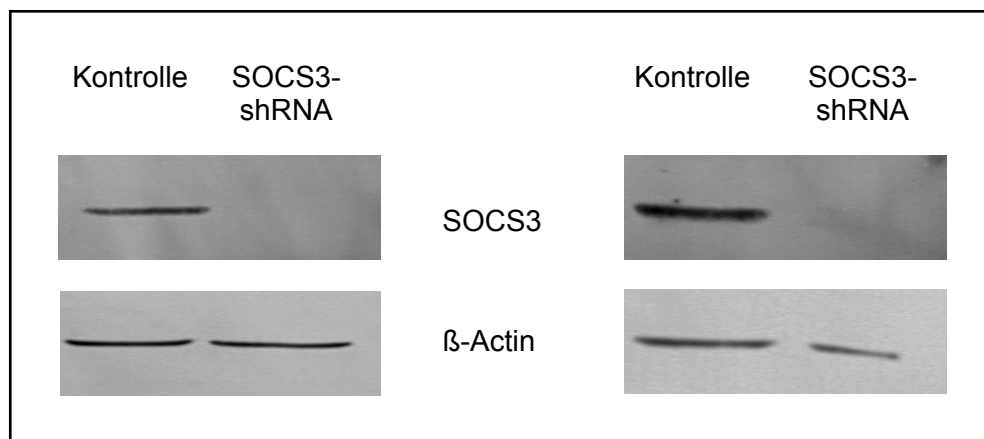


Abbildung 5.3: Nachweis des SOCS3-„Knockdown“ in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie mittels Western Blot.

Dargestellt ist die SOCS3-Expression der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie im Vergleich zu einer nativen Kontrolle, wobei β -Actin als Auftragskontrolle diente. Die Darstellung zeigt zwei repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

Der Versuch zeigt eine deutliche Abnahme von SOCS3 in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie im Vergleich zur nativen JAR-Zell-Kontrolle [Abb. 5.3].

Der Nachweis des Protein-„Knockdown“ in SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen erfolgte 24 h nach Transfektion, ebenfalls mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot. Als Kontrolle dienten „untransfizierte“ JAR-Zellen, die mit einem OligofectamineTM-Transfektionsansatz ohne RNA-Oligonukleotide behandelt wurden. Des Weiteren erfolgten zwei Kontrolltransfektionen mit einer nicht-genomischen siRNA um Sequenzunabhängige Transfektionseffekte auszuschließen.

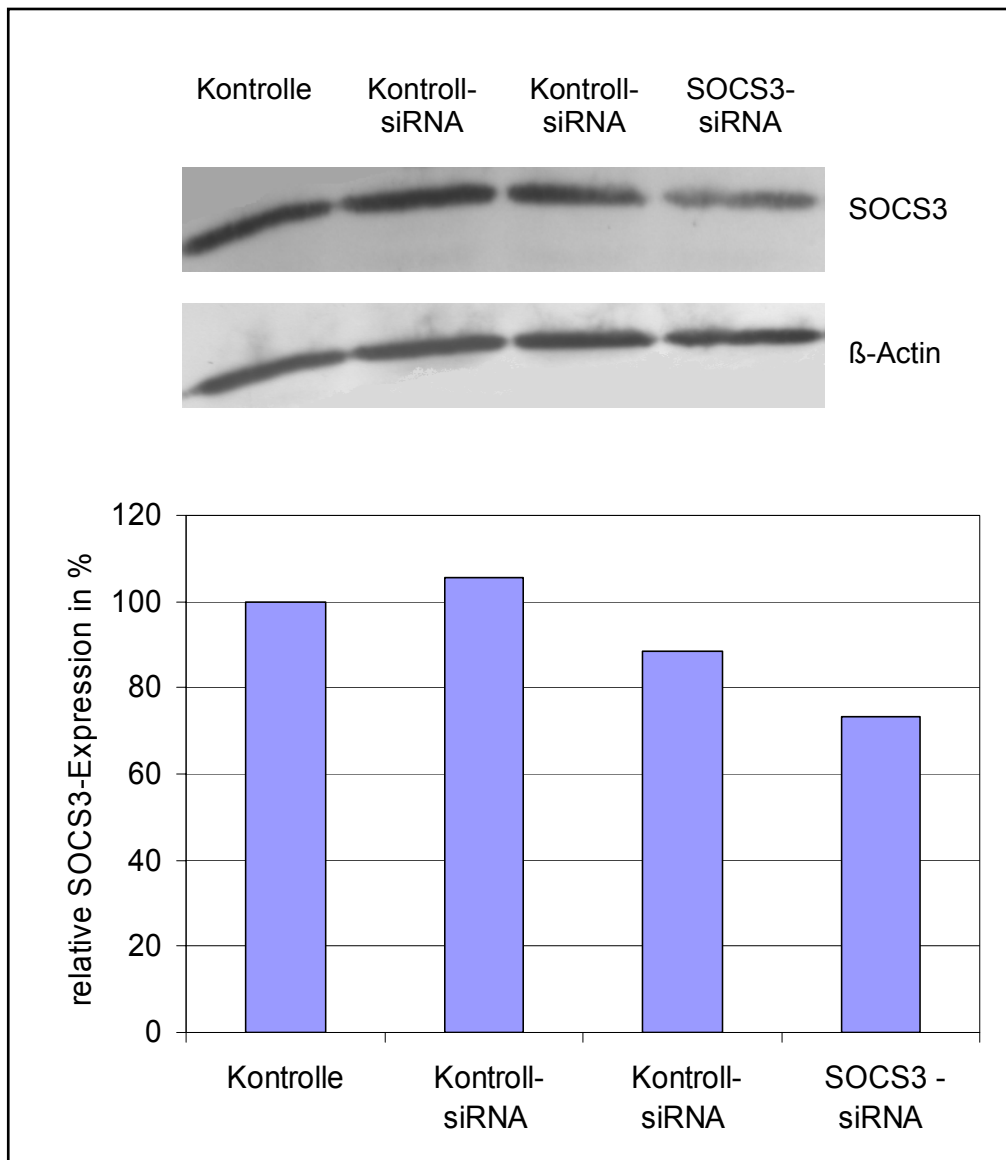


Abbildung 5.4: Nachweis des SOCS3-„Knockdown“ in SOCS3-siRNA transfizierten JAR-Zellen mittels Western Blot.

Dargestellt ist die relative SOCS3-Expression siRNA-transfizierter JAR-Zellen nach 24 h im Vergleich zu zwei nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer nativen Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte dabei mit Hilfe des mitgeführten Referenzproteins β -Actin. Die Darstellung ist das repräsentative Ergebnis zweier unabhängiger Experimente.

Im Western Blot zeigte sich 24 h nach Transfektion mit nicht-genomischer Kontroll-siRNA keine eindeutige Beeinflussung der SOCS3-Expression, während bei den siRNA-transfizierten JAR-Zellen eine deutliche Reduktion des SOCS3-Levels um 27% zu verzeichnen war [Abb. 5.4].

5.2 Nachweis des Einflusses von LIF auf die SOCS3-Expression

Der Einfluss von LIF auf die Expression von SOCS3 wurde in nativen JAR-Zellen untersucht, die jeweils für 30 min bzw. 2 h und 5 h mit dem Zytokin in einer Konzentration von 10 ng/ml im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte der SOCS3-Nachweis mittels Western Blot, wobei unstimulierte native JAR-Zellen als Kontrolle dienten.

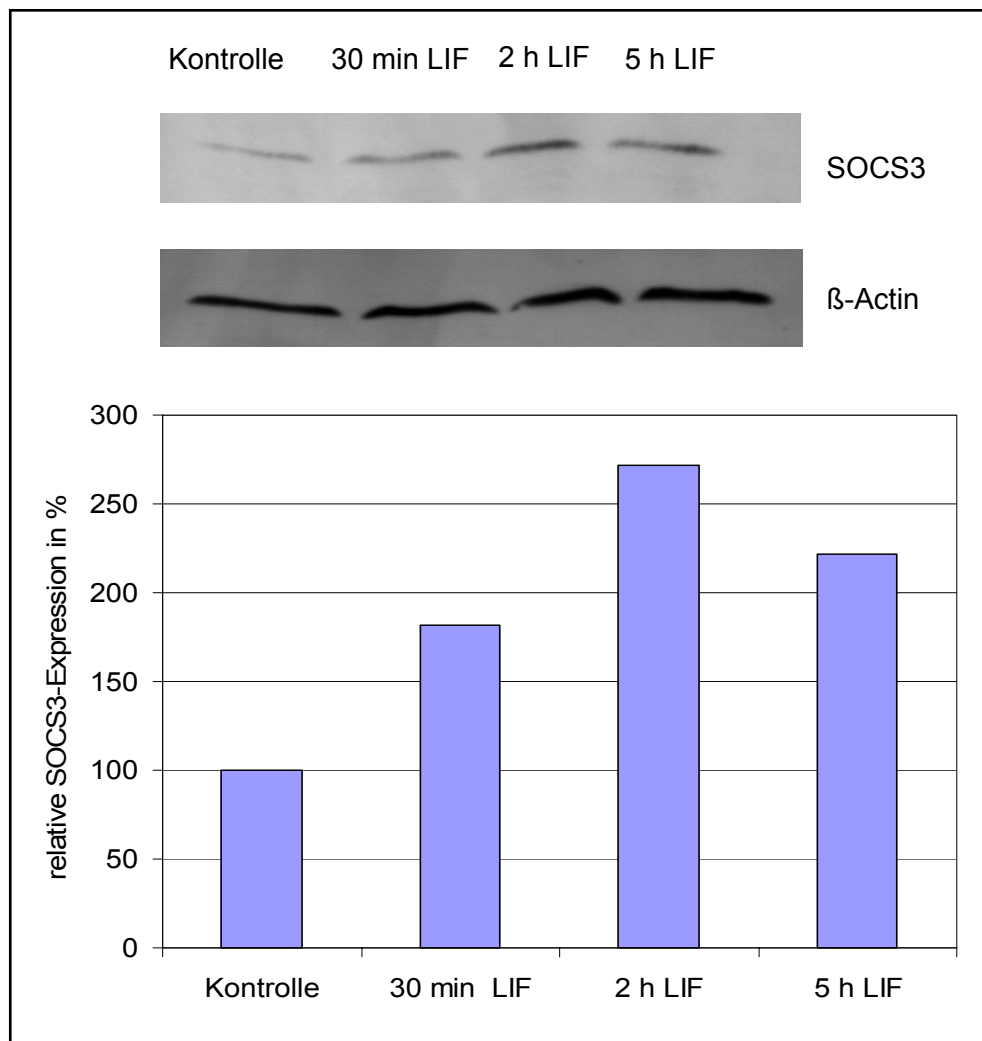


Abbildung 5.5: Nachweis des Einflusses von LIF auf die SOCS3-Expression in JAR-Zellen mittels Western Blot.

Dargestellt ist die relative SOCS3-Expression in nicht-transfizierten JAR-Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml LIF für 30 min, 2 h und 5 h im Vergleich zu einer nicht stimulierten nativen Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte dabei mit Hilfe des mitgeführten Referenzproteins β -Actin. Die Darstellung ist das repräsentative Ergebnis dreier unabhängiger Experimente.

Der Versuch zeigte, dass die Stimulation mit LIF zu einer Steigerung der SOCS3-Expression führt, die nach 30 min 81% beträgt und nach 2 h mit 171% ihr Maximum erreicht hat. Danach erfolgte eine Verminderung, sodass 5 h nach Stimulation mit LIF ein Wert von 121% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erreicht war [Abb. 5.5].

5.3 Einfluss des SOCS3-„Knockdown“ auf die STAT3-Phosphorylierung

Um zu untersuchen welchen Einfluss der „Knockdown“ von SOCS3 auf die Phosphorylierung von STAT3 hat, wurde sowohl in siRNA-transfizierten JAR-Zellen als auch in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot Phosphotyrosin-STAT3 nachgewiesen. Als Kontrolle dienten zum einen native und zum anderen mit nicht-genomischer siRNA-transfizierte JAR-Zellen.

Jeder dieser unstimulierten Proben wurde jeweils eine Stimulierte gegenübergestellt, bei der die Zellen mit LIF in einer Konzentration von 10 ng/ml für 30 min im Brutschrank inkubiert wurden.

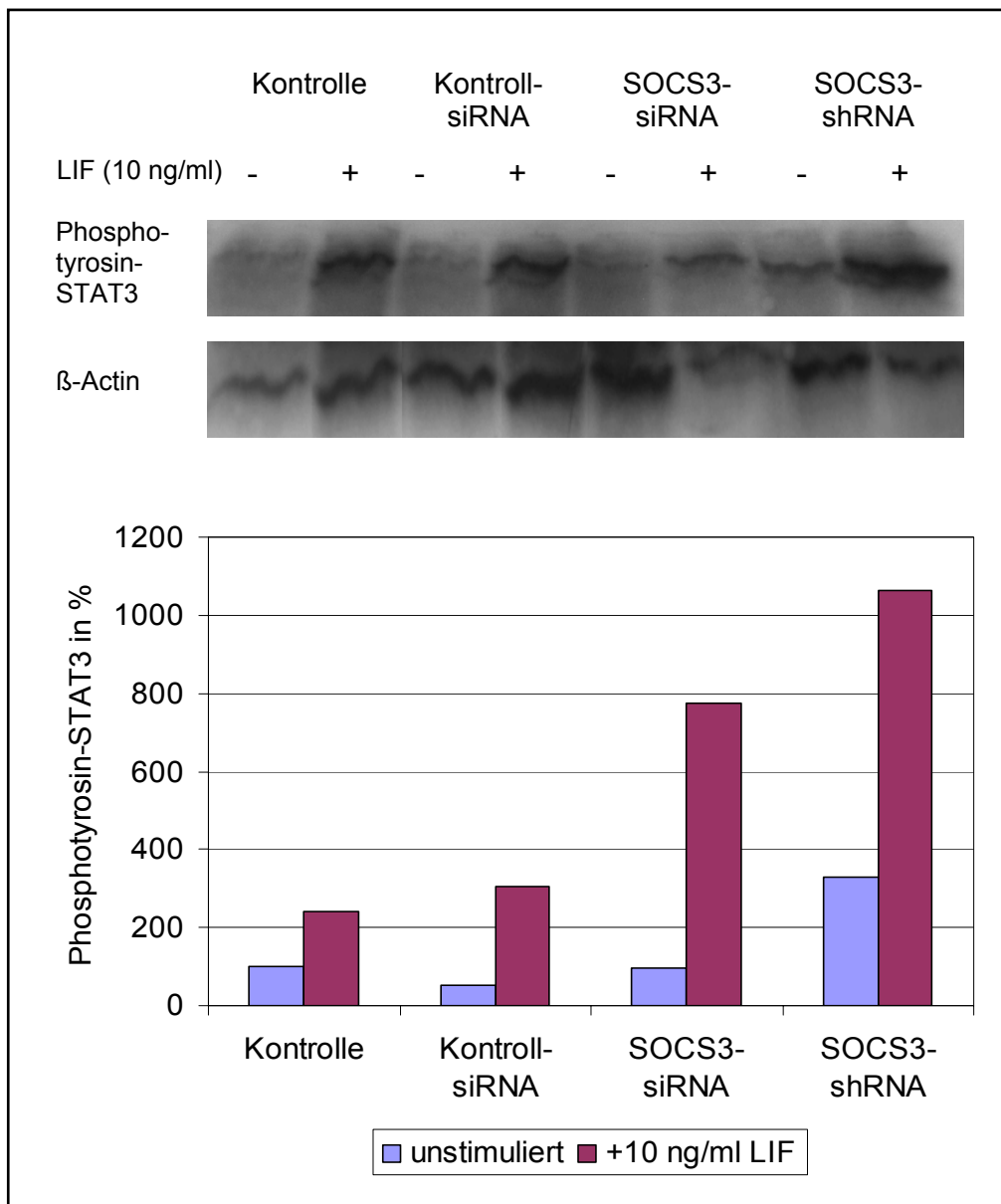


Abbildung 5.6: Nachweis von Phosphotyrosin-STAT3 in JAR-Zellen mit und ohne LIF-Stimulation mittels Western Blot.

Dargestellt ist die relative Gesamt-Phosphotyrosin-STAT3-Expression siRNA- oder shRNA-transfizierter JAR-Zellen im Vergleich zu einer nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer nativen Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte dabei mit Hilfe des mitgeführten Referenzproteins β -Actin. Die Darstellung ist das repräsentative Ergebnis zweier unabhängiger Experimente.

Im Versuch zeigte sich eine Erhöhung des Phosphotyrosin-STAT3-Levels in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie auf über das Dreifache (327%) im Vergleich zur nativen Kontrolle, während es in den SOCS3-siRNA-transfizierten

Zellen der untransfizierten Kontrolle entsprach (95%). Verglichen mit der nicht-genomisch transfizierten Kontrolle, fand sich eine Erhöhung von Phosphotyrosin-STAT3 in den SOCS3-siRNA-Zellen auf etwa das Doppelte (189%). Nach Stimulation mit LIF konnte in allen Zellen eine deutliche Erhöhung des Phosphotyrosin-STAT3-Levels nachgewiesen werden, wobei diese in der nicht-genomisch transfizierten Kontrolle und den SOCS3-siRNA-transfizierten Zellen mit ca. 600% und 800% höher ausfiel als bei der nativen Kontrolle (242%) und der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie (325%) [Abb. 5.6].

5.4 Funktionelle Tests

Die funktionellen Tests dienen zur Untersuchung des Einflusses von SOCS3 auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von JAR-Zellen. Dabei wurde jeder unstimulierten Probe eine Stimulierte gegenübergestellt, die zuvor mit LIF inkubiert wurde. Um eine Konzentration des Zytokins zu ermitteln, die für alle funktionellen Tests geeignet ist, fand zunächst ein Vorversuch statt.

5.4.1 Vorversuch

In diesem Versuch sollte die Konzentration von LIF ermittelt werden, die JAR-Zellen am meisten in ihrem Wachstumsverhalten beeinflusst. Hierzu wurden 3×10^4 JAR-Zellen in FKS-haltigem DMEM resuspendiert und mit LIF in Konzentrationen von 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml und 40 ng/ml für 24 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Proliferation, die mit einer Kontrolle unstimulierter JAR-Zellen verglichen wurde.

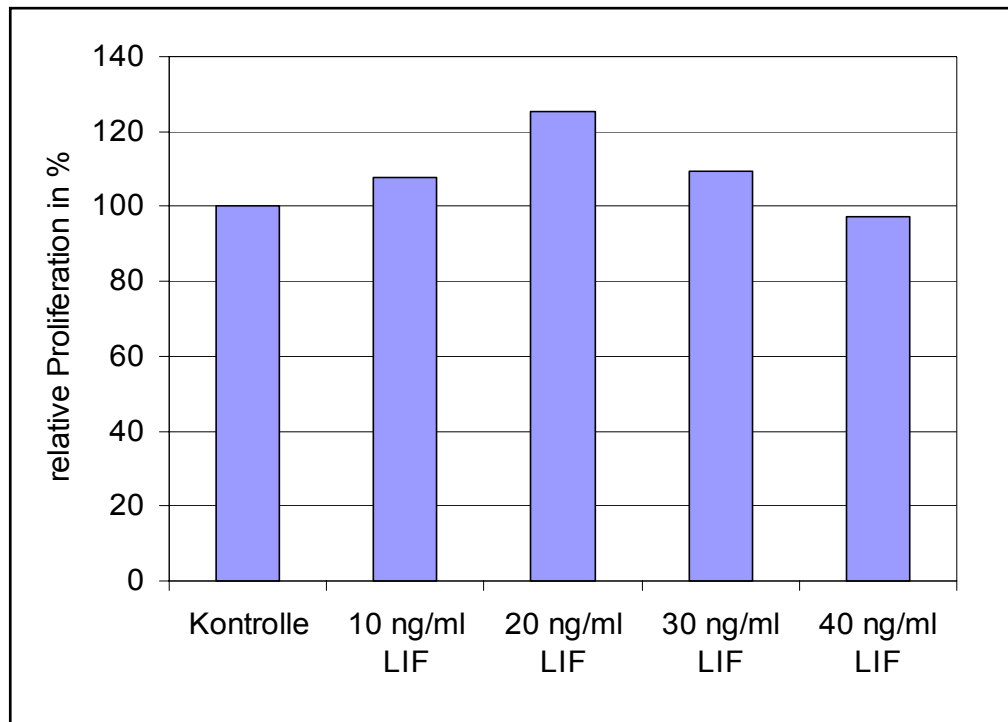


Abbildung 5.7: Proliferation von JAR-Zellen nach 24-stündiger LIF Stimulation.

Dargestellt ist die relative Proliferation von 3×10^4 JAR-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit LIF in unterschiedlichen Konzentrationen. Als Vergleich dient eine Kontrolle nativer JAR-Zellen, die hierbei als 100% definiert wurde. Die Darstellung ist das repräsentative Ergebnis zweier unabhängiger Experimente.

Der größte Effekt auf die Proliferation der stimulierten JAR-Zellen zeigte sich bei einer LIF-Konzentration von 20 ng/ml mit einer Erhöhung um ca. 25% [Abb. 5.7]. Somit wurde für die Stimulation der JAR-Zellen in allen folgenden funktionellen Tests LIF in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt.

5.4.2 Proliferationsassay

Der Einfluss von SOCS3 auf die Proliferation von JAR-Zellen wurde in 24 h Assays mit je 3×10^4 Zellen untersucht. Dabei wurden der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie und den mit SOCS3-siRNA transfizierten Zellen zwei Kontrollen gegenübergestellt. Zum einen mit nicht-genomischer siRNA transfizierte JAR-Zellen und zum anderen eine „untransfizierte“ Kontrolle, die mit einem OligofectamineTM-Transfektionsansatz ohne RNA-Oligonukleotide behandelt wurde. Die Zellen blieben für den Versuch entweder unstimuliert oder wurden mit 20 ng/ml LIF inkubiert.

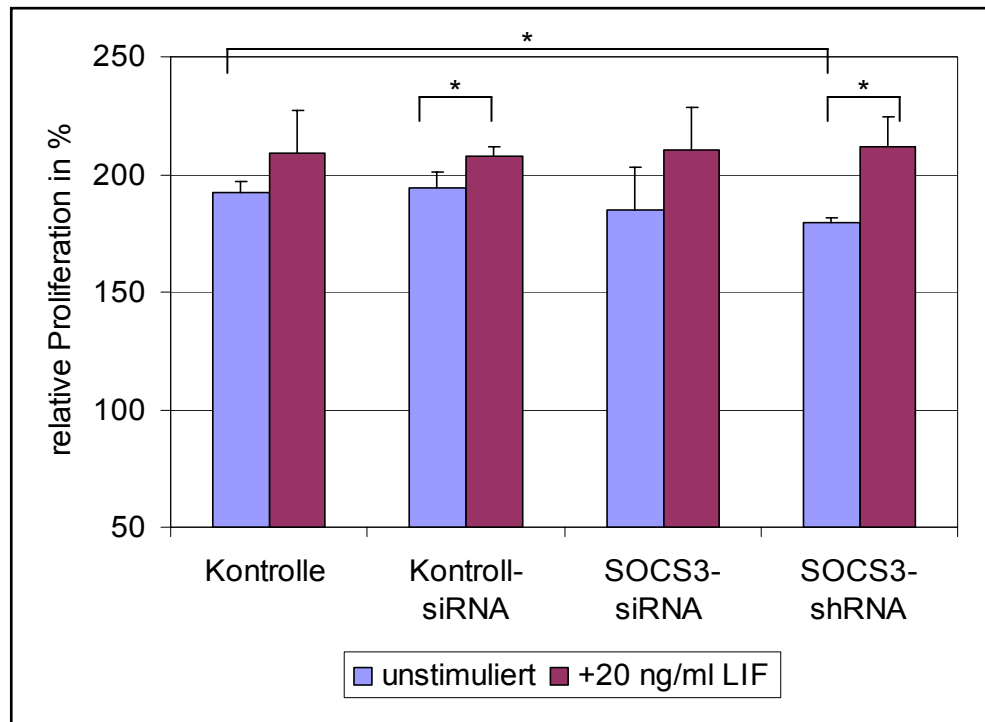


Abbildung 5.8: Proliferationsverhalten von JAR-Zellen mit und ohne LIF-Stimulation.

Dargestellt ist die relative Proliferation siRNA- oder shRNA-transfizierter JAR-Zellen im Vergleich zu einer nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer „untransfizierten“ Kontrolle. Eingesetzt wurden jeweils 3×10^4 Zellen, was 100% entspricht [MW+STABW; t-Test: * $p < 0,05$, $n=3$].

Das Proliferationsverhalten der „untransfizierten“ Kontrolle sowie der mit nicht-genomischer siRNA transfizierten JAR-Zellen ist mit 192% und 194% annähernd gleich. Im Gegensatz dazu findet sich bei den SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen eine leicht verminderte Proliferationsrate von 184% (nicht signifikant) und in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie eine Verminderung der Proliferationsrate auf 180% (signifikant).

Die Zugabe von 20 ng/ml LIF stimuliert die beiden Kontrollen etwa gleichermaßen, sodass sich im Vergleich mit den jeweiligen unstimulierten Proben eine Erhöhung von 17% für die „untransfizierte“ Kontrolle (nicht signifikant) sowie eine Steigerung der Proliferation von 13% für die Kontroll-siRNA (signifikant) ergibt. Auch in den beiden „Knockdown“-Proben findet sich eine gesteigerte Proliferation nach LIF-Stimulierung, die jedoch mit 25% bei den SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen (nicht signifikant) und 32% bei der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie (signifikant) etwas höher ausfällt. In der Gesamtproliferation ist nach der Stimulierung

mit LIF kein nennenswerter Unterschied zwischen „Knockdown“- und Kontrollzellen mehr auszumachen [Abb. 5.8].

5.4.3 Migrationsassay

Um den Einfluss von SOCS3 auf das Migrationsverhalten von JAR-Zellen zu untersuchen, wurden 24 h Assays mit je 3×10^4 Zellen durchgeführt. Auch hier wurde die stabil transfizierte SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie, mit SOCS3-siRNA transfizierte JAR-Zellen sowie eine „untransfizierte“ und eine mit nicht-genomischer siRNA transfizierte Kontrolle untersucht. Den unstimulierten Zellen wurde jeweils eine mit 20 ng/ml LIF stimulierte Probe entgegengestellt.

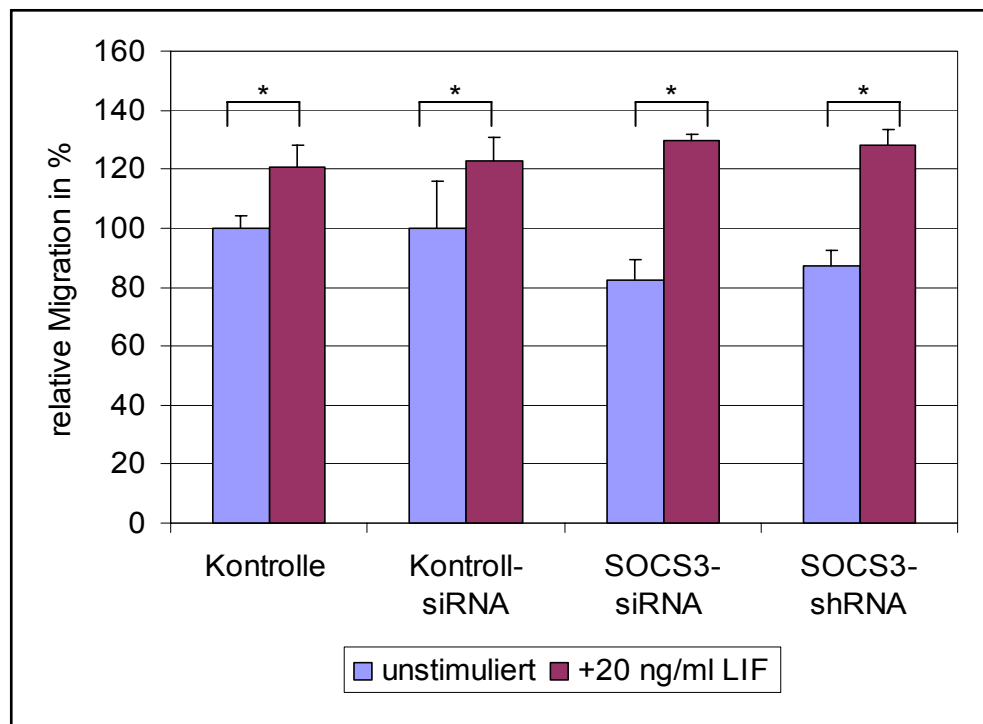


Abbildung 5.9: Migrationsverhalten von JAR-Zellen mit und ohne LIF-Stimulation.

Dargestellt ist die relative Migration siRNA- oder shRNA-transfizierter JAR-Zellen im Vergleich zu einer nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer „untransfizierten“ Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Eingesetzt wurden jeweils 3×10^4 Zellen, wobei die Anzahl der migrierten Zellen anhand der Proliferationsrate aus Kapitel 5.3.2 normalisiert wurde [MW+STABW; t-Test: * $p < 0,05$, $n=3$].

Bezüglich des Migrationsverhaltens weisen die mit nicht-genomischer siRNA transfizierten JAR-Zellen (mit 100% relativer Migrationsrate) keinen Unterschied zur „untransfizierten“ Kontrolle auf. Die SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen und die stabil transfizierte SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie weisen mit 82% und 87% bezüglich der „untransfizierten“ Kontrolle ein vermindertes Migrationsverhalten auf, welches jedoch nicht signifikant ist.

Nach Zusatz von 20 ng/ml LIF lässt sich in allen Proben eine signifikante Steigerung des Migrationsverhaltens feststellen. Diese Steigerung fällt in der „untransfizierten“ und in der nicht-genomisch transfizierten Kontrolle mit 21% und 23% jedoch deutlich niedriger aus als in den SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen und der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie, wo mit 47% und 41% ein ausgeprägter Zuwachs zu verzeichnen ist.

Bezüglich der Gesamtanzahl migrierter Zellen nach Stimulation mit LIF treten in den verschiedenen Proben keine nennenswerten Unterschiede mehr auf [Abb. 5.9].

5.4.4 Invasionsassay

Um festzustellen welchen Einfluss SOCS3 auf die Invasivität von JAR-Zellen nimmt, wurden 24 h Assays mit je 3×10^4 Zellen durchgeführt. Dazu wurden der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie und den mit SOCS3-siRNA transfizierten JAR-Zellen wiederum zwei Kontrollen gegenübergestellt. Eine mit nicht-genomischer siRNA transfizierte Kontrolle und eine „untransfizierte“ Kontrolle, die nur mit einem OligofectamineTM-Transfektionsansatz ohne RNA-Oligonukleotide behandelt wurde. Es wurden jeweils unstimulierte und mit 20 ng/ml LIF stimulierte Zellen untersucht.

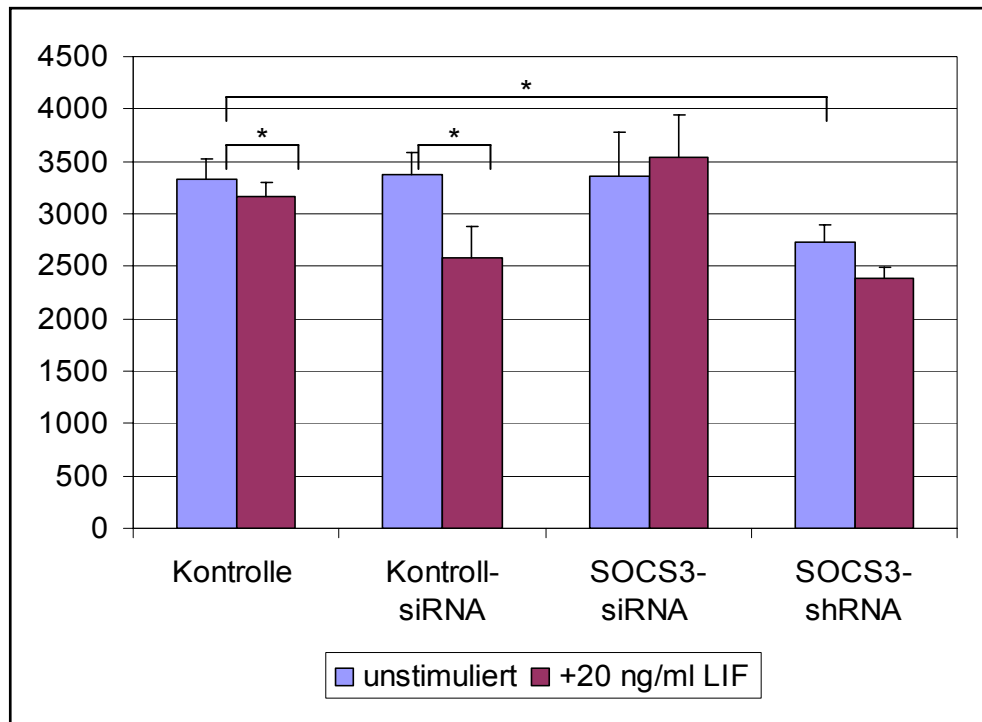


Abbildung 5.10: Invasionsverhalten von JAR-Zellen mit und ohne LIF-Stimulation.

Dargestellt ist die relative Invasion siRNA- oder shRNA-transfizierter JAR-Zellen im Vergleich zu einer nicht-genomisch transfizierten (Kontroll-siRNA) und einer „untransfizierten“ Kontrolle, die hierbei als 100% definiert wurde. Eingesetzt wurden jeweils 3×10^4 Zellen, wobei die Anzahl der invadierten Zellen anhand der Proliferationsrate aus Kapitel 5.3.2 normalisiert wurde [MW+STABW; t-Test: * $p < 0,05$, $n=3$].

Hinsichtlich des Invasionsverhaltens unterscheiden sich die mit nicht-genomischer siRNA transfizierten JAR-Zellen nicht von der „untransfizierten“ Kontrolle. Auch die SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen weisen diesbezüglich keinen Unterschied auf. In der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie findet sich jedoch eine signifikante Verminderung der Invasivität von 18% im Vergleich zur „untransfizierten“ Kontrolle.

Die Stimulation der Zellen mit LIF, in einer Konzentration von 20 ng/ml, führt in beiden Kontrollen zu einer Verminderung der Invasivität, die in beiden Fällen Signifikanz aufweist, allerdings in den mit nicht-genomischer siRNA transfizierten JAR-Zellen mit 24% deutlich höher ausfällt als in den „untransfizierten“ Kontroll-JAR-Zellen (5%). In den SOCS3-„Knockdown“-Zellen zeigten sich bezüglich des Invasionsverhaltens nach LIF-Stimulation verschiedene Ergebnisse. Die mit SOCS3-siRNA transfizierten JAR-Zellen wiesen eine Erhöhung der Invasivität von 5% auf

(nicht signifikant) und die stabil transfizierte SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie eine Verminderung von 10% (nicht signifikant) [Abb. 5.10].

6. Diskussion

Untersuchungen zur Proliferation und vor allem zur Migration und Invasion von Trophoblastzellen sind von großer Bedeutung, da sie zum einen das Verstehen von schwangerschaftsassozierten Krankheiten ermöglichen könnten und zum anderen, als Modell des Tumorwachstums, für die onkologische Forschung von Interesse sind. In der intrazellulären Signalkaskade, die zur Expression von Proteinen führt, die oben genannte Zellfunktionen in Trophoblast- als auch in Tumorzellen vermittelt, spielt das Regulationsmolekül STAT3 eine entscheidende Rolle (Fitzgerald et al. 2007, Frank 2007). Die Kontrolle dieses Proteins wird, neben verschiedenen anderen Mechanismen, vor allem über die Expression von SOCS3 als Negativregulator vermittelt (Frank 2007).

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, den Einfluss von SOCS3 auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten trophoblastärer Zellen näher zu charakterisieren. Als Modell für die in vivo vorzufindenden Trophoblastzellen diene hierbei die Chorionkarzinomzelllinie JAR. Da diese Zellen jedoch maligne transformiert sind, besteht die Möglichkeit, dass deren Genexpressionsmuster von dem physiologischer Trophoblastzellen abweicht (Bischof und Irminger-Finger 2005). Damit ist die Übertragung der Versuchsergebnisse auf das Verhalten von Trophoblastzellen in vivo kritisch zu bewerten.

Die Verwendung von JAR-Zellen bietet trotz allem entscheidende Vorteile. Sie können leicht in Kultur gehalten werden, während die Isolierung von Trophoblastzellen ein sehr aufwendiges Verfahren darstellt, das oft nur ungenügende Mengen an Zellmaterial liefert und einen erheblichen Stress für die Zellen bedeutet. Zudem erlauben Untersuchungen an einer Zelllinie wie JAR eine bessere Vergleichbarkeit von Ergebnissen als Experimente mit Trophoblastzellen, die aus verschiedenen Plazenten isoliert werden und deshalb individuelle Unterschiede aufweisen können.

6.1 SOCS3-„Knockdown“ mittels RNAi

Um den Einfluss von SOCS3 auf das Verhalten von JAR-Zellen zu untersuchen, sollte das Protein zum einen durch eine Transfektion mit SOCS3-siRNA transient herabreguliert werden. Zum anderen kam eine JAR-Zelllinie zum Einsatz, die mit Hilfe eines SOCS3-shRNA tragenden Vektors so transfiziert wurde, dass ein stabiler

„Knockdown“ des Proteins resultiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion kann einerseits durch die Abnahme des Zielproteins erfolgen. Ebenso lässt sich der Erfolg eines RNAi vermittelten „Knockdown“ durch eine auf Degradierung beruhende Minderung der mRNA nachweisen. Um zu zeigen, dass sowohl die auf siRNA beruhende als auch die stabile Vektor-vermittelte Transfektion zu einer Reduktion der mRNA-Menge von SOCS3 führt, wurde zunächst eine PCR durchgeführt.

Hierbei zeigte sich jedoch weder für die Transfektion mit SOCS3-siRNA noch für den stabilen Vektor-vermittelten SOCS3-„Knockdown“ eine Reduzierung der mRNA-Menge für SOCS3 bezüglich der Kontrollen. Im Falle der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie ließ sich sogar eine größere Menge an mRNA detektieren. Da es sich bei der PCR allerdings um ein semi-quantitatives Verfahren handelt, wurde mit den gleichen Proben eine rtPCR durchgeführt, die als quantitative Methode die Ergebnisse der PCR validieren sollte. Dabei bestätigte sich, dass die Transfektion mit SOCS3-siRNA zu keiner Verminderung der Menge an SOCS3 mRNA führt, während in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie sogar signifikant mehr SOCS3 mRNA als in der nativen Kontrolle zu finden war.

Wie aber lässt sich dieses Ergebnis erklären? Um diese Frage zu beantworten, erfolgte zunächst die Proteinbestimmung von SOCS3 mittels SDS-PAGE und Western Blot. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob sowohl die transiente Transfektion mit siRNA als auch die stabile Vektor-vermittelte Transfektion erfolgreich waren. In den SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen zeigte sich nach 24 h lediglich eine geringe Verminderung der SOCS3-Expression von 27%, während der „Knockdown“ in der vektortransfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie so effizient war, dass die Nachweisgrenze des Western Blots unterschritten wurde.

Dieser Unterschied zwischen den beiden Transfektionsmethoden kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen werden Unterschiede bezüglich der liposomalen Transfektion von Vektoren gegenüber siRNA diskutiert, die Einfluss auf die Transfektionseffizienz nehmen können. So kommt es bei der liposomalen Transfektion mit siRNA zum Teil zur unvollständigen Umhüllung der Oligonukleotide, was sie enzymatischen und physikalischen Angriffen aussetzt (Spagnou et al. 2004). Dies könnte eine weniger effiziente Übertragung von siRNA in die Zelle erklären, die mit einem geringeren Protein-„Knockdown“ als in mit Vektor-transfizierten Zellen einhergeht. Ursächlich hierfür könnte neben der geringeren Transfektionseffizienz auch eine geringe Stabilität der verwendeten siRNA sein (Li et

al. 2006a). Des Weiteren ist der Proliferationsstatus der Zelle ein wichtiger, zu beachtender Faktor, da sich bei jeder Zellteilung die Konzentration an siRNA in der Zelle und somit der „Knockdown“ vermindert (Omi et al. 2004).

Ein weiterer Unterschied der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie gegenüber den mit SOCS3-siRNA transfizierten Zellen besteht darin, dass sie nach der Transfektion selektiert werden konnten. Diese Sortierung erfolgte dabei zunächst per Durchflusszytometrie mit Hilfe eines durch den Vektor exprimierten, grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und danach mit dem zytotoxischen Antibiotikum Neomycin. Da der SOCS3-shRNA-Vektor eine Neomycinresistenz beinhaltetete, bestand keine Empfindlichkeit der transfizierten Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung. In der so „gereinigten“ stabilen Zelllinie erfolgt in allen Zellen die kontinuierliche Herstellung von shRNA, wodurch die oben genannten Probleme der siRNA-Transfektion bezüglich Transfektionseffizienz, Proliferationsstatus der Zelle und Stabilität der siRNA entfallen. Im Gegensatz dazu ist eine Selektion bei siRNA-transfizierten Zellen nicht möglich, wodurch sich in jedem Transfektionsansatz untransfizierte Zellen befinden. Das führt zu einer weiteren Verminderung der Effizienz des Protein-„Knockdowns“ siRNA-transfizierter Zellen im Vergleich zur stabilen Vektor-vermittelten Transfektion.

6.2 STAT3-Phosphorylierung

Die Ergebnisse des SOCS3 Western Blots lassen somit den Schluss zu, dass die stabile Transfektion der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie sicher erfolgreich war, während die Transfektion mittels SOCS3-siRNA eine deutlich niedrigere Effizienz aufwies. In einem folgenden Versuch in dem die STAT3-Phosphorylierung untersucht wurde, fanden sich Ergebnisse die dieses Resultat bestätigen.

Da SOCS3 in Form einer klassischen Feedback-Hemmung die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT3 verhindert, ist damit zu rechnen, dass sich im Falle eines erfolgreichen „Knockdown“ des Proteins erhöhte Mengen an phosphoryliertem STAT3 detektieren lassen. Tatsächlich fand sich in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie ein Anstieg der STAT3-Phosphorylierung auf 327% im Vergleich zur nativen Kontrolle, während sich in mit SOCS3-siRNA transfizierten Zellen kein Unterschied zur Kontrolle ergab. Dies bekräftigt die vorher

bezüglich des Erfolgs der Transfektion gewonnenen Erkenntnisse. Als interessant erweisen sich in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse bezüglich der STAT3-Phosphorylierung nach 30-minütiger Stimulation mit LIF.

Dieses schwangerschaftsrelevante Zytokin ist in der Lage STAT3 über den JAK/STAT-Signalweg zu aktivieren (Cheng et al. 2001) und damit die Expression von SOCS3 zu steigern (Emery et al. 2006). So konnte für JAR-Zellen mittels Western Blot eine Steigerung der SOCS3-Expression nach LIF-Stimulierung gezeigt werden, die nach 2 h ihr Maximum erreicht hat und danach langsam wieder abfällt. Diese recht rasche Erhöhung des Regulationsproteins spricht für eine schnelle zytokinvermittelte STAT3-Aktivierung über den JAK/STAT-Weg, der ebenso zügig mit Hilfe von SOCS3 entgegengewirkt werden soll. Diese Regulation der STAT3-Aktivierung, welche schon nach 30 min ihr Maximum erreicht (Fitzgerald et al. 2005a), ist von großer Bedeutung, da eine dauerhafte Erhöhung von aktiviertem STAT3 mit einem erhöhten Risiko maligner Transformation in Verbindung gebracht wird (Frank 2007).

Bezüglich der STAT3-Phosphorylierung nach 30-minütiger Inkubation mit LIF konnte durch die Stimulierung eine deutliche Erhöhung gezeigt werden. Dieser Effekt ist sowohl in den SOCS3-siRNA-transfizierten JAR-Zellen als auch in der stabilen SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie stärker ausgeprägt als in den Kontrollen, was auf die verminderte Inhibierung aufgrund mangelnder SOCS3-Expression zurückzuführen ist.

Dieses Ergebnis spricht jedoch dafür, dass trotz geringer Transfektionseffizienz der siRNA-Methode ein „Knockdown“-Effekt nachweisbar ist. Warum zeigt sich aber dennoch keine Erhöhung der STAT3-Phosphorylierung in unstimulierten JAR-Zellen 24 h nach Transfektion mit SOCS3-siRNA im Vergleich zur nativen Kontrolle? Eine mögliche Erklärung bietet sich durch die Existenz einer Reihe anderer Negativregulatoren des JAK/STAT-Weges (Starr und Hilton 1999), die eine überschießende STAT3-Aktivierung im Falle eines partiellen SOCS3-„Knockdowns“ verhindern könnten.

6.3 SOCS3-Protein-„Knockdown“ trotz SOCS3 mRNA-Erhöhung

Mit Hilfe der Western Blots konnte somit gezeigt werden, dass der SOCS3-Protein-„Knockdown“ in der vektortransfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie sicher ist und in den mit siRNA transfizierten JAR-Zellen, wenngleich mit geringerer Effizienz, ebenfalls funktioniert. Dennoch bleibt die zuvor aufgeworfene Frage bestehen, weshalb in der rtPCR keine Verminderung bzw. sogar eine Erhöhung an SOCS3 mRNA detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis ist schon im Falle der mit geringer Effizienz transfizierten siRNA-JAR-Zellen ungewöhnlich und lässt genügend Raum für Diskussionen. Die im Falle der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie vorgefundene starke Erhöhung von SOCS3 mRNA ist jedoch ein überraschendes Ergebnis, dem es auf den Grund zu gehen gilt. Im Folgenden werden verschiedene Ansätze diskutiert, die versuchen sollen eine Antwort auf diese spannende Frage zu geben.

Zunächst sollte jedoch eine kritische Hinterfragung der Methode erfolgen, um sicherzustellen, dass das Experiment erfolgreich durchgeführt wurde. Zu diesem Zweck erfolgte für die rtPCR eine Analyse der Schmelzkurve, welche allerdings keine zusätzlichen Peaks zeigte und somit keinen Hinweis auf unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere erbrachte. Um zu kontrollieren ob die verwendeten Primer funktionieren, wurde eine PCR mit einem SOCS3-Überexpresssionvektor durchgeführt. Dabei wurde das Amplifikat auf einem Agarose-Gel mit Hilfe eines DNA-Längenstandards identifiziert und entsprach der erwarteten Größe von 66 bp. Überdies spricht auch die in der rtPCR vorgefundene Steigerung der SOCS3-Expression nach Zugabe von LIF gegen einen methodischen Misserfolg. Im Zusammenhang mit der im Western Blot gezeigten Erhöhung der STAT3-Phosphorylierung nach LIF-Stimulation spricht dieses Ergebnis letztlich für die aus der Literatur bekannte LIF abhängige, STAT3-vermittelte Aktivierung der SOCS3-Expression (Krebs und Hilton 2001). Wenn man also von einer erfolgreichen Durchführung des Experiments ausgeht, muss es für das unerwartete Resultat der rtPCR eine andere Begründung geben.

Eine mögliche Erklärung für dieses ungewöhnliche Ergebnis liegt im durch die Primer detektierten RNA-Abschnitt. So konnte gezeigt werden, dass Primer auch an Fragmente degradierter mRNA binden und es bei entsprechender Stabilität dieser Bruchstücke erst relativ spät zu einer Verminderung des gemessenen mRNA-Levels

kommt (Hahn et al. 2004). Die in den Experimenten verwendete SOCS3-siRNA bindet an die mRNA im Abschnitt zwischen bp 485 und 503, um diese dort für die RISC-vermittelte Degradierung zu markieren. Da das in der rtPCR amplifizierte Produkt jedoch dem mRNA Abschnitt von bp 639 bis 704 entspricht, könnte das detektierte Signal bei entsprechender Stabilität vom zweiten Fragment der degradierten mRNA stammen. Die Möglichkeit des Nachweises eines Bruchstückes der Degradation erklärt allein jedoch nicht das deutlich erhöhte SOCS3 Signal in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie, da diese Fragmente letztlich nicht stabiler als normale mRNA sein sollten und eine Kumulation somit nicht erfolgen dürfte.

Eine Erklärung hierfür ließe sich allerdings aus der Theorie für stabile Degradationsfragmente in Verbindung mit der Funktion von SOCS3 in der JAK/STAT-Signalkaskade ableiten. Dabei würde ausgehend von der Degradierung der mRNA kein SOCS3-Protein mehr gebildet werden, was im Western Blot bestätigt werden konnte. Dadurch entfällt die negative Feedback-Hemmung der STAT3-Phosphorylierung, was zu einer vermehrten Bildung aktivierter STAT3-Moleküle führt. Auch dieser Nachweis konnte mit Hilfe des Western Blots geführt werden. Da der SOCS3-Promotor ein STAT3-Bindeelement enthält (Krebs und Hilton 2001), könnte aus dieser STAT3-Aktivierung eine vermehrte Transkription und damit eine gesteigerter Bildung spezifischer SOCS3-mRNA resultieren. Unter der Voraussetzung, dass die aus der mRNA mittels RNAi entstandenen Fragmente eine ausreichende Stabilität aufweisen, könnte die dauerhafte STAT3-Aktivierung zu einer Kumulation dieser Bruchstücke führen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die in der rtPCR sichtbare vermeintliche Erhöhung der SOCS3 mRNA.

Hinzu kommt, dass sich noch im Zellkern befindliche, nicht degradierte SOCS3 mRNA-Transkripte in der rtPCR ebenfalls detektiert werden, da für die Experimente eine Isolation der Gesamt-RNA erfolgte. Ist die Aktivierung der Transkription von SOCS3 entsprechend hoch, darf auch dieser Effekt in der Problembetrachtung nicht außer Acht gelassen werden.

Für eine vermehrte Transkription des Zielgens könnten neben dem zuvor beschriebenen, durch die Funktion von SOCS3 erkläraren, Mechanismus auch so genannte Off-Target-Effekte verantwortlich sein. Dies bedeutet, dass die verwendete siRNA auch an Nicht-Ziel-mRNA binden kann und diese für die RISC-vermittelte Degradation markiert. Somit kann es zu „Knockdown“-Effekten kommen, die nicht allein das gewünschte Protein betreffen (Qiu et al. 2005).

Würden Off-Target-Effekte in diesem Fall Gene ausschalten, die in den JAK/STAT-Signalweg eingreifen, könnte dies eine gesteigerte SOCS3-Transkription erklären. Denkbar wäre beispielsweise ein ungewünschter „Knockdown“ anderer Negativregulatoren der JAK/STAT-Kaskade, der andere Proteine der SOCS-Familie oder PIAS betreffen könnte und somit ebenfalls zu einer gesteigerten Transkription von SOCS3 führt.

Aus diesem Grund wurde in unserem Auftrag von der Firma Ambion eine Analyse der verwendeten siRNA bezüglich eventuell auftretender Off-Target-Effekte durchgeführt. Dabei zeigten sich für die von uns verwendete siRNA signifikante Ähnlichkeiten mit Transkripten der im Folgenden angeführten Gene: Humanes Desmoplakin, dessen Protein-Produkt eine Schlüsselrolle in den Zell-Zell-Kontakt vermittelnden Desmosomen spielt (Zhou et al. 2004); das Aktin bindende Protein Anillin, das Funktionen während der Zellteilung übernimmt und in verschiedenen Krebsarten erhöht vorgefunden wird (Hall et al. 2005); KCTD5, ein Protein, das eine Homologie zu einem Kanalprotein besitzt und zu dessen Funktion wenig bekannt ist und zuletzt GIMAP1, eine GTPase aus der IMAP-Proteinfamilie, welcher Kontrollfunktionen für das Zellüberleben zugeschrieben werden (Krucken et al. 2004).

Durch die genannten Proteine besteht somit kein offensichtlicher Einfluss auf die JAK/STAT-Signalkaskade, durch den sich eine Erhöhung der Transkription von SOCS3 erklären ließe. Dennoch könnten durch unerwünschten „Knockdown“ der oben genannten Proteine verschiedene Wirkungen auf die Zellen resultieren, die sich vor allem in ihrem funktionellen Ausmaß nur schwer abschätzen lassen. Für die Zukunft empfiehlt sich daher, vor allem in Hinblick auf funktionelle Tests, die Verwendung mehrerer unterschiedlicher siRNA-Sequenzen zum „SOCS3-Silencing“, was allerdings in der vorliegenden Arbeit noch keine Berücksichtigung fand.

Neben den angesprochenen Off-Target-Effekten besteht überdies eine weitere Möglichkeit, die eine Aktivierung der Transkription von SOCS3 erklären könnte. Neuere Veröffentlichungen bezüglich der Transfektion mit doppelsträngiger RNA konnten zeigen, dass siRNA-Oligonukleotide in der Lage sind gezielt an Promotorregionen verschiedener Gene zu binden und somit eine anhaltende sequenzspezifische Induktion dieser Zielgene zu bewirken (Janowski et al. 2007, Li et al. 2006b). Demzufolge könnte die verwendete siRNA selbst für eine vermehrte

Transkription von SOCS3 durch Bindung an die Promotorregion des Gens verantwortlich sein.

Die diskutierten Ergebnisse und daraus gewonnenen Erkenntnisse machen einige Schwächen der angewandten Transfektionsmethoden deutlich und lassen somit weitere Verbesserungsmöglichkeiten für die Zukunft offen. Ein umfassender Ausblick dazu soll am Ende der Diskussion erfolgen.

6.4 Einfluss des SOCS3-„Knockdown“ auf trophoblastäre Zellen

Der nachgewiesene, erfolgreiche SOCS3-„Knockdown“ bildete die Grundlage für die nachfolgenden funktionellen Versuche. In diesen sollte der Einfluss von SOCS3 auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten von JAR-Zellen untersucht werden.

Bei mangelnder Negativregulation des JAK/STAT-Signalweges, z.B. durch ein SOCS3-Defizit, kann es zu einer konstitutiven STAT3-Aktivierung kommen, die unter anderem die Expression von Onkogenen stimuliert und deshalb in Verbindung mit Karzinogenese gebracht wird (Yoshimura et al. 2007). So konnte tatsächlich in verschiedenen Malignomen der Brust und der Prostata eine überschießende Aktivität von STAT3 gefunden werden (Dhir et al. 2002, Garcia et al. 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich ein „Knockdown“ von SOCS3, der zu einer nachweislichen Erhöhung von aktiviertem STAT3 führt, fördernd auf die Proliferation, Migration und Invasion der betreffenden Zellen auswirkt.

Im Experiment zeigte sich jedoch im Gegensatz zu dieser Annahme eine Hemmung bezüglich der oben genannten zellulären Funktionen für unstimulierte JAR-Zellen. Zur Erklärung dieser Beobachtung kommen verschiedene Mechanismen in Betracht. Zum einen existiert eine Vielzahl anderer Negativregulatoren des JAK/STAT-Signalweges, die im Falle eines Defizits an SOCS3 möglicherweise verstärkt exprimiert werden, um dieses zu kompensieren. So ist beispielsweise das Protein PIAS3 in der Lage aktivierte STAT3-Dimere zu binden und sie damit in ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor zu hemmen (Chung et al. 1997). Des Weiteren existieren diverse Phosphatasen, die aktivierte STAT3-Moleküle nach deren Translokation in den Nukleus dephosphorylieren, was ihre Bindung an DNA-Erkennungssequenzen verhindert (Schindler et al. 2007). Neben diesen beiden Beispielen finden sich weitere Regulationsmechanismen, die in ihrem Zusammenspiel für eine Hemmung

des Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhaltens der JAR-Zellen trotz erhöhten Phosphotyrosin-STAT3-Levels verantwortlich sein könnten. Allerdings ließe sich dies nur schwer mit der zuvor diskutierten Transkriptionserhöhung von SOCS3, die als Erklärung für die rtPCR-Ergebnisse diene, in Verbindung bringen.

Eine weitere Erklärung für die Hemmung der angesprochenen zellulären Funktionen bietet sich jedoch durch die zuvor diskutierten Off-Target-Effekte der von uns verwendeten SOCS3-siRNA. Dabei könnte es durch den ungewollten „Knockdown“ eines oder mehrerer der aufgeführten Proteine zur unerwünschten Beeinflussung der untersuchten Zellfunktionen kommen. Eine Verminderung des Proteins Anillin, das für die Zellteilung von Bedeutung und in verschiedenen Malignomen erhöht ist, könnte dabei für eine Hemmung der Proliferation verantwortlich sein. In der komplexen Regulation zellulärer Funktionen wie Proliferation, Migration und Invasion könnte auch ein Mangel der anderen Proteine, für die Off-Target-Effekte vermutet werden, zu den beobachteten Effekten führen. Dies ließe sich in weiterführenden Arbeiten mittels PCR oder Western Blot prüfen.

Somit wäre denkbar, dass trotz eines erhöhten Levels an phosphoryliertem STAT3 in den „Knockdown“-Zellen, die damit einhergehende Stimulation der untersuchten Zellfunktionen (Frank 2007) durch Off-Target-Effekte verschleiert wird. Auch die in den Experimenten beobachtete Steigerung der Proliferation und Migration nach Zugabe von LIF ließe sich so erklären. Da LIF in der Lage ist STAT3 über die JAK/STAT-Kaskade zu aktivieren (Krebs und Hilton 2001), führt die Stimulierung mit dem Zytokin zu einer nachweislichen Erhöhung des Phosphotyrosin-STAT3-Levels im Vergleich zum unstimulierten „Knockdown“. Die damit verbundene Steigerung der STAT3-vermittelten Stimulation könnte somit die gegensätzliche Wirkung der Off-Target-Effekte übersteigen und zu einer effektiven Steigerung der Proliferation und Migration führen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die Proliferation und Migration in den „Knockdown“-Zellen nach LIF-Stimulation deutlicher ansteigt als in den Kontrollen, da hier auch eine stärkere Erhöhung des Phosphotyrosin-STAT3-Levels festgestellt werden konnte.

Im Unterschied zur Proliferation und Migration fand sich bezüglich der Invasivität von JAR-Zellen jedoch eine Verminderung nach Stimulation mit LIF. Dies steht im Gegensatz zu unseren Erwartungen, da in der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 gezeigt werden konnte, dass eine Stimulierung mit LIF die Invasionsfähigkeit trophoblastärer Zellen durch die Aktivierung von STAT3 zu steigern vermag

(Fitzgerald et al. 2005a). Die erhöhte Invasivität der JEG-3-Zellen wurde dabei auf eine STAT3-vermittelte Steigerung der MMP-Expression, bei gleichzeitiger Hemmung von Negativregulatoren wie TIMP, zurückgeführt (Poehlmann et al. 2005). Allerdings finden sich in der Literatur auch gegensätzliche Angaben, die eine Hemmung der MMP-Expression nach STAT3-Aktivierung in Zytotrophoblasten beschreiben (Bischof et al. 1995), was eine Verminderung der Invasionsfähigkeit bewirken könnte. Diese beiden unterschiedlichen Beobachtungen erklären sich durch die Fähigkeit von aktiviertem STAT3 in Abhängigkeit des Zellkontextes verschiedene Funktionen auszuüben (Lu et al. 2006). Somit könnte die Reduktion der Invasivität LIF-stimulierter JAR-Zellen auf einer STAT3-vermittelte Reduktion der MMP-Expression beruhen. Ein weiterer Erklärungsansatz für dieses unerwartete Ergebnis ist methodischer Natur und bezieht sich auf die Qualität des verwendeten Matrigels. In neueren, bislang unveröffentlichten Experimenten unserer Gruppe haben sich mit fertig gekauftem Matrigel die von uns erwarteten Ergebnisse, also eine Steigerung der Invasion nach LIF-Stimulation, erzielen lassen. Dies deutet auf einen Einfluss der Geldichte bzw. der Gelzusammensetzung für die Zellfunktionen und den damit verbundenen Fähigkeiten der Zelle zur Invasion hin.

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

7.1 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von SOCS3 auf das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten der Chorionkarzinomzelllinie JAR untersucht werden. Mittels RNAi erfolgte sowohl eine stabile als auch eine transiente Herabregulierung der SOCS3-Expression. Dabei zeigte sich im Western Blot in der stabil transfizierten SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie im Vergleich zur mit SOCS3-siRNA transfizierten JAR-Zellen ein deutlich geringeres SOCS3-Proteinlevel. Dies deutet zum einen auf eine höhere Transfektionseffizienz dieser, deutlich aufwendigeren, Methode hin, steht aber auch im Zusammenhang mit der Selektion der Vektor-tragenden Zellen mittels GFP und Neomycin.

Bei keiner der beiden Transfektionsarten ließ sich jedoch eine Verminderung der SOCS3-mRNA nachweisen, in der SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie sogar eine Erhöhung. Dies lässt sich am ehesten durch das „Knockdown“-bedingte Fehlen des Negativregulators SOCS3 im JAK/STAT-Signalweg und der damit verbundenen erhöhten SOCS3-Transkription in Verbindung mit dem Nachweis stabiler Degradationsfragmente erklären.

Die aus der Literatur bekannte STAT3 aktivierende Wirkung des schwangerschaftsrelevanten Zytokins LIF über den JAK/STAT-Signalweg (Cheng et al. 2001) konnte auch in JAR-Zellen durch die erhöhte STAT3-Phosphorylierung und die Steigerung der SOCS3-Expression bestätigt werden.

Die aufgrund der erhöhten STAT3-Phosphorylierung erwarteten Einflüsse von LIF auf das zelluläre Verhalten von JAR-Zellen konnten allerdings nicht bzw. nicht in vollem Umfang bestätigt werden. So führte die Stimulation zwar zu einer gesteigerten Proliferation und Migration, jedoch zu einer Abnahme der Invasivität der JAR-Zellen. Auch die erwartete fördernde Wirkung des SOCS3-„Knockdowns“ auf Zellfunktionen unstimulierter JAR-Zellen ließ sich nicht bestätigen, es zeigte sich eher ein vermindertes bzw. ein gleich bleibendes Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten.

Diese Ergebnisse lassen sich zum Teil auf methodische Probleme wie Off-Target-Effekte der verwendeten siRNA oder Zusammensetzung des Matrigels zurückführen, die aber in Zukunft gelöst werden können und eine erneute Durchführung funktioneller Tests nach sich ziehen sollten. Darüber hinaus ist die Regulation

zellulärer Funktionen wie Proliferation, Migration und Invasion ein sehr komplexer Vorgang, der sich in verschiedenen Zelltypen unterscheiden kann. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine kontinuierliche STAT3-Aktivierung zwar mit Karzinogenese im Zusammenhang steht, sich aber dennoch keine stereotypen Auswirkungen auf einzelne zelluläre Funktionen ableiten lassen (Lu et al. 2006). Da SOCS3 nur ein Molekül in verschiedenen, miteinander interagierenden Ebenen der Negativregulation von STAT3 ist, wird dessen Ausfall vermutlich durch die Aktivierung anderer Mechanismen ausgeglichen. Dies macht deutlich warum der Ausfall dieses einzelnen Regulationsproteins offensichtlich keine übergeordnete Rolle für die Kontrolle von Proliferation, Migration und Invasion spielt. Eine SOCS3-Defizienz scheint somit nicht der alleinige Auslöser für schwerwiegende Schwangerschaftskomplikationen wie z. B. Präeklampsie oder vorzeitige Plazentalösung zu sein. In Plazentations-assoziierten Krankheitsbildern scheint demnach eine komplexere Regulationsstörung vorzuliegen, was eine Beteiligung von SOCS3 natürlich nicht ausschließt.

7.2 Ausblick

Wie in der Diskussion angedeutet, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur unter Vorbehalt verwertbar und bedürfen der Überprüfung durch eine kontinuierliche Verbesserung der angewandten Methoden. Dabei ist zunächst eine Verbesserung der Transfektionseffizienz in siRNA-transfizierten Zellen anzustreben, wogegen für die stabil transfizierte SOCS3-shRNA-JAR-Zelllinie eine Kontroll-shRNA-Zelllinie etabliert werden sollte. Damit ließen sich transfektionsbedingte Wirkungen besser von spezifischen Effekten des SOCS3-„Knockdowns“ differenzieren. Eine weitere methodische Verbesserung ist bezüglich der gewählten siRNA anzustreben. Diese sollte dabei möglichst keine Off-Target-Effekte aufweisen und die mRNA in der von den verwendeten Primern detektierten Sequenz für die Degradation markieren. So müsste eine Detektion stabiler Fragmente in der rtPCR vermieden werden und der Erfolg des „Knockdowns“ auf mRNA-Ebene nachweisbar sein.

Der methodischen Optimierung sollte sich eine Wiederholung der funktionellen Tests anschließen, um einen Einfluss von Off – Target - Effekten auf die bisherigen

Ergebnisse auszuschließen und diese gegebenenfalls zu verifizieren. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine multifaktoriell regulierte Steuerung von Proliferation, Migration sowie Invasion sprechen, könnte in weiterführenden Arbeiten der Einfluss anderer Regulationsfaktoren des JAK/STAT-Signalweges wie PIAS untersucht werden. Ebenso vermögen Betrachtungen anderer STAT3-beeinflussender Signaltransduktionswege, wie der MAP-Kinase-Kaskade, weitere Erkenntnisse bezüglich der Fehlregulation trophoblastärer Zellen und der Entstehung von Schwangerschaftsassozierten Krankheiten bringen.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu den in vivo stattfindenden Prozessen zu ermöglichen, sollten die angesprochenen Untersuchungen auch in Primärzellen angestrebt werden. Damit könnte geklärt werden in wie weit sich transformierte Zellen in ihrem Verhalten von physiologischen Trophoblastzellen unterscheiden.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Quellenverzeichnis der Abbildungen

- Abb. Widmung: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Da_Vinci_Studies_of_Embryos_Luc_Viatour.jpg (modifiziert)
- Abbildung 2.1: www.kup.at/kup/images/browser/9228.jpg (modifiziert)
- Abbildung 2.2: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>)
- Abbildung 2.3: modifiziert nach Alexander WS. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. Nat Rev Immunol, 2(6): 410-6.
- Abbildung 2.4: Shuai K, Liu B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. Nat Rev Immunol, 3(11): 900-11.
- Abbildung 2.5: modifiziert nach Alexander WS. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. Nat Rev Immunol, 2(6): 410-6.
- Abbildung 4.1: www.ambion.com/figs/f01371.gif (modifiziert)

Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. Molekularbiologie der Zelle. Vierte Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Alexander WS. 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2 (6):410-416.
- Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. 1991. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (24):11408-11412.
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. 1995. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol*, 34 (4):225-230.
- Bischof P, Irminger-Finger I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (1):1-16.
- Boyle K, Robb L. 2008. The role of SOCS3 in modulating leukaemia inhibitory factor signalling during murine placental development. *J Reprod Immunol*, 77 (1):1-6.
- Briscoe J, Guschin D, Muller M. 1994. Signal transduction. Just another signalling pathway. *Curr Biol*, 4 (11):1033-1035.
- Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. 2001. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (15):8680-8685.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.

- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. 1994. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 120 (12):3657-3666.
- Dhir R, Ni Z, Lou W, DeMiguel F, Grandis JR, Gao AC. 2002. Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate*, 51 (4):241-246.
- Emery B, Merson TD, Snell C, Young KM, Ernst M, Kilpatrick TJ. 2006. SOCS3 negatively regulates LIF signaling in neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*, 31 (4):739-747.
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. 2005. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (11):2284-2296. (a)
- Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. 2005. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy*, 88:181-199. (b)
- Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Suman P, Gupta SK, Schleussner E, Markert UR. 2007. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) and Trophoblast Invasion. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 4(6):322-330.
- Frank DA. 2007. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett*, 251 (2):199-210.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 20 (20):2499-2513.

- Hahn P, Schmidt C, Weber M, Kang J, Bielke W. 2004. RNA interference: PCR strategies for the quantification of stable degradation-fragments derived from siRNA-targeted mRNAs. *Biomol Eng*, 21 (3-5):113-117.
- Hall PA, Todd CB, Hyland PL, McDade SS, Grabsch H, Dattani M, Hillan KJ, Russell SE. 2005. The septin-binding protein anillin is overexpressed in diverse human tumors. *Clin Cancer Res*, 11 (19 Pt 1):6780-6786.
- Hannon GJ. 2002. RNA interference. *Nature*, 418 (6894):244-251.
- Janowski BA, Younger ST, Hardy DB, Ram R, Huffman KE, Corey DR. 2007. Activating gene expression in mammalian cells with promoter-targeted duplex RNAs. *Nat Chem Biol*, 3 (3):166-173.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285 (1-2):1-24.
- Krebs DL, Hilton DJ. 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19 (5):378-387.
- Krucken J, Schroetel RM, Muller IU, Saidani N, Marinovski P, Benten WP, Stamm O, Wunderlich F. 2004. Comparative analysis of the human gimap gene cluster encoding a novel GTPase family. *Gene*, 341:291-304.
- Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. 1997. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*, 12 (3):569-574.
- Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. 2001. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril*, 76 (6):1091-1096.

- Leonard WJ, O'Shea JJ. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*, 16:293-322.
- Lessey BA. 1995. Endometrial Integrins. *Endocrinologist*, 3 (5):214-221.
- Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. 2006. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*, 5 (18):2103-2109. (a)
- Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, Enokida H, Dahiya R. 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (46):17337-17342. (b)
- Licht P, Russu V, Wildt L. 2001. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med*, 19 (1):37-47.
- Lu Y, Fukuyama S, Yoshida R, Kobayashi T, Saeki K, Shiraishi H, Yoshimura A, Takaesu G. 2006. Loss of SOCS3 gene expression converts STAT3 function from anti-apoptotic to pro-apoptotic. *J Biol Chem*, 281 (48):36683-36690.
- Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC. 1999. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. *Am J Pathol*, 154 (4):1105-1114.
- Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. 1999. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*, 5 (11):1055-1058.
- Moore KL. 1990. *Embryologie Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen*. Dritte Auflage. Stuttgart, New York: Schattauer.
- Murray MJ, Lessey BA. 1999. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 17 (3):275-290.

- Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A. 1996. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (2):801-806.
- Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y, Saiura A, Matsubara K, Kitagawa T, Yamamoto J, Kubo T, Yoshikawa H. 2005. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 24 (42):6406-6417.
- Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. 2004. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett*, 558 (1-3):89-95.
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, 1 (6):92-95.
- Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. 2005. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta*, 26 Suppl A:S37-41.
- Qiu S, Adema CM, Lane T. 2005. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 33 (6):1834-1847.
- Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. 2003. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases-a review. *Placenta*, 24 (Suppl. A):76-85.
- Schindler C, Levy DE, Decker T. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 282 (28):20059-20063.
- Sharkey A. 1998. Cytokines and implantation. *Rev Reprod*, 3 (1):52-61.
- Shuai K, Liu B. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 3 (11):900-911.

- Spagnou S, Miller AD, Keller M. 2004. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry*, 43 (42):13348-13356.
- Starr R, Hilton DJ. 1999. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*, 21 (1):47-52.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:59.
- Vogiagis D, Salamonsen LA. 1999. Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol*, 160 (2):181-190.
- Wink M. 2004. *Molekulare Biotechnologie: Konzepte und Methoden*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Yoshimura A, Naka T, Kubo M. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 7 (6):454-465.
- Zhou X, Stuart A, Dettin LE, Rodriguez G, Hoel B, Gallicano GI. 2004. Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *J Cell Sci*, 117 (Pt 15):3129-3140.

Anhang

Lebenslauf

Name	Torben de la Motte
Geburt	06.09.1980 in Jena
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

1987-1989	EOS Ernst Thälmann, Jena
1989-1991	POS Karl-Liebknecht, Jena
1991-1999	staatliches Gymnasium „Albert Schweitzer“, Jena

Zivildienst

10/1999-09/2000	Gemeindehaus der Ev.-Luth. Kirchgemeinde, Jena/Lobeda
-----------------	--

Studium

Oktober 2001	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
September 2003	Ärztliche Vorprüfung
12/2006-12/2007	Praktisches Jahr: Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungs-Chirurgie Universitätsklinikum Jena Klinik für Innere Medizin II Katholisches Krankenhaus „St. Johann Nepomuk“ Erfurt Klinik für Neurologie Universitätsklinikum Jena
Mai 2008	Ärztliche Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

Seit September 2008	Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie Universitätsklinikum Jena
---------------------	---

Jena, den 10.06.2010

Publikationsliste

Scientific Papers

Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, **de la Motte T**, Poehlmann TG, Markert UR. 2005. Signal transduction in trophoblast invasion. Chem Immunol Allergy, 88:181-199 (b).

Published Abstracts

Khachatryan L, Poehlmann TG, Morales DM, Forti ALL, Ermisch C, Weber M, Trück M, **de la Motte T**, Fitzgerald JS, Schleussner E, Markert UR

Das System von Janus Kinasen (JAKs), Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) und deren Inhibitoren reguliert die Invasivität von trophoblastären Zellen.

8. Arbeitskreis Molekularbiologie der DGGEF, Essen, Germany. J Reproduktionsmed Endokrinol 2008;5:368

Poster presentation.

Markert UR, Poehlmann TG, Stojic J, **de la Motte T**, Kaemmerer U, Schleussner E

Das STAT3-SOCS3-Gleichgewicht in Trophoblastzellen: Regulator der Invasivität. XX. Akademische Tagung deutschsprachiger Hochschullehrer in der Gynäkologie und Geburtshilfe, September 2007; Lübeck, Germany. Arch Gynecol Obstet 2007; 276: S456.

Poster presentation.

Poehlmann TG, Voigt S, Meissner A, **de la Motte T**, Trueck M, Wengenmayer T, Markert UR.

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Interleukin-6 Induced Intracellular Signalling in Jeg-3 choriocarcinoma cells.

Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology, September 2005, Kiel, Germany. Immunobiol. 2005, 210: 501.

Poster presentation.

Poehlmann TG, Voigt S, Meissner A, **de la Motte T**, Trueck M, Wengenmayer T, Markert UR.

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Interleukin-6 Induced Intracellular Signalling in Jeg-3 choriocarcinoma cells.

Am J Reprod Immunol 2005; 54:168.

Poster presentation.

Rudloff I, Poehlmann TG, **de la Motte T**, Bachmann S, Schleussner E, Rodde N, Sandra O, Markert UR.

SOCS3 Controls STAT3 signaling and invasion of trophoblast and choriocarcinoma cells. 5th European Congress of Reproductive Immunology, August 2007; Berlin, Germany. Am J Reprod Immunol 2007; 58: 232.

Poster presentation

Book articles

Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Förster K, **de la Motte T**, Poehlmann TG, Markert UR.

Intracellular signals in invading trophoblast cells.

Chem Immunol Allergy 2005; 88:181-199.

Invited Lectures

Poehlmann TG, Voigt S, Meissner A, **de la Motte T**, Trueck M, Wengenmayer T, Markert UR

Leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 induced intracellular signalling in Jeg-3 choriocarcinoma cells.

2. Simposio Latinamericano Sobre Interacción Materno-Fetal (SLIMP).

Nov 2005, Santiago de Chile.

Other conference presentations

Poehlmann TG, **de la Motte T**, Markert UR

Trophoblast invasion and proliferation is regulated by Suppressor of Cytokine Signalling 3 (SOCS3)

16th European Congress of Immunology, Paris, September 2006

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei den Personen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht oder durch Ihre Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle bei Herrn PD Dr. med. Udo R. Markert für die freundliche Überlassung der Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Jianqian Wu vom Max-Planck-Institut für chemische Ökologie für die prompte und jederzeit freundliche Unterstützung und Hilfe bei den Experimenten zur Genexpression, insbesondere der rtPCR.

Weiterhin bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Plazenta-Labors für das offene und freundschaftliche Arbeitsumfeld, stellvertretend seien hier Dipl. biochem. Ina Rudloff, Dipl. biol. Anne Braunschweig und Dipl. chem. Stefan Neubeck genannt. Herrn Dr. rer. Nat. Tobias Pöhlmann und Frau Dipl. biochem. Susann Busch möchte für die Unterstützung in zahlreichen inhaltlichen und methodischen Fragen gesondert erwähnen.

Meiner Freundin Katja Palige für ihre Geduld sowie die zahl- und hilfreichen Hinweise und Anregungen während der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Nicht zuletzt natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich durch das gesamte Studium und die Jahre der Arbeit an dieser Dissertation begleitet, aufgemuntert und unterstützt haben und mir so den Rückhalt in jeglicher Hinsicht gaben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. med. habil. Udo R. Markert

Dr. rer. nat. Tobias Pöhlmann

Dr. rer. nat. Jianqian Wu

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena den 10.06.2010

Verwendete Geräte und Materialien

Geräte

Autoklav

KSG-112

KSG-Ölching

Blot-Kammer

Biometra

Brutschränke

HERAcell CO2 Inkubator

Heraeus Instruments

FUNCTIONline CO2 Inkubator

Heraeus Instruments

Durchflußzytometer

Flowmax Galaxy

DAKO

FACSCalibur

Becton Dickinson

Auswertungs-Software „Cell Quest Pro“

Becton Dickinson

Elektrophoresekammern

Mini-V8x10

Life Technology

SunriseTM

Life Technology

Gel-Dokumentationsgeräte

MF-ChemiBIS 3.2

Biostep

Auswertungsprogramm „GelCapture“

DNR Bio-Imaging Systems

GeneGenius Gel Imaging System

Syngene

GeneSnap Software

Syngene

Mikroskop (Auflicht)

Axiovert 25

Zeiss

Mikroskop (Fluoreszenz)

Axioplan 2

Zeiss

+ Axiocam Hrc

Zeiss

+ HBO 100W

Zeiss

Mikrozentrifuge

Roth

Neubauerkammer

Optik Labor

Pipetten

Eppendorf, Gilson, Hirschmann

Orbitalschüttler

Polymax 1040

Heidolph

Spektrophotometer

Cary UV 50

Bio Varian

ND 1000 (Nano drop R)

Peglab

Thermocycler

Mastercycler gradient (PCR)

Eppendorf

ABI Prism 7700 sequence-
detection system (rtPCR)

Applied Biosystems

Tisch-Thermostat

ThermoStat plus

Eppendorf

Thermomixer comfort

Eppendorf

Waagen

Basic

Satorius Basic

Owa Labor

VEB Wägetechnik Rapido

Wasserbad

Huber-Medingen

Zentrifugen

Biofuge 13

Heraeus

Labofuge T

Heraeus

Mikro 22R

Hettich

Verbrauchsmittel

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)

Sarstedt

HybondTM-C Extra

Amersham Pharmacia Biotech

Küvetten Halb-Mikro

Greiner

MACS Separation Columns LS

Miltenyi Biotech

„Mini RNA Isolation II KitTM“

Zymo Research

PP-Testtubes Falcon

Greiner

qPCR Core kit for SYBR® Green

Eurogentec

SuperScript® First-Strand Synthesis System	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	Fermentas
UV Film, Skeletal/RA 18x24cm	Kodak
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten: 6-Well	Becton-Dickinson Labware
12-Well + 24-Well	Nunc
48-Well + 96-Well	Cellstar

Reagenzien

Acrylamid 40%	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Sigma
Antibiotic Antimycotic Solution (AAS)	SIGMA
Bisacrylamid (BAA)	Roth
Bromphenolblau	Roth
Chemiluminescent detection reagent	Cell Signaling Technology
Coomassie Brilliantblau G250	Roth
Cytometric Bead Array Kit (-II)	BD
Dimethylsulfoxid	Merck
ECL-Detektion Reagent	Cell Signaling
Entwicklungs- und Fixierlösung	Kodak
Essigsäure	Baker
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraacetat	Sigma
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD
FACS Lysing	BD
FACS Rinse	BD
Fetales Kälberserum	Bio Whittaker
Glycerin	Roth
HBSS	Bio Whittaker
Human LIF	Chemicon

Matrigel	BD
β-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Molekulargewichtsmarker (Roti-Standard)	Cell Signaling Technology
Molekulargewichtsmarker (Dual Color)	BIO-RAD
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodesylsulfat (SDS)	Roth
Nuklease-freies Wasser	Ambion
Oligofectamin™ Reagent	Invitrogen
Optimem	Gibco
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.)	PAA
PBS	PAA Laboratories
Poly-L-Lysin	SIGMA
Ponceau S	Roth
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
siRNA Annealing Buffer (5x)	Ambion
TEMED	Pharmacia Biotech
Tris-Hydrochlorid	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Trypsin EDTA	BioWhittaker
Zell-Lysepuffer	Cell Signaling Technology

Zellkulturmedien

DMEM	Bio Whittaker
DMEM Medium I (DMEM + 10% FKS + 2% AAS)	
DMEM Medium II (DMEM + 30% FKS)DMEM	
RPMI 1640	Firma: PAA Laboratories GmbH

Antikörper

Primärantikörper für Western Blot

Mouse monoclonal anti-human IgG2b SOCS3 (SO1)

(Santa Cruz Biotechnology)

Rabbit monoclonal anti-human β -Aktin

(Cell Signaling Technology)

Rabbit anti-human Phospho-STAT3 (Tyr-705)

(Cell Signaling Technology)

HRP-konjugierte Sekundärantikörper

Anti-rabbit IgG

Cell Signaling Technology

Anti-mouse IgG

Cell Signaling Technology

Oligonukleotide

siRNA

Ambion

Kontrolle (nicht-genomisch)

Sense: 3`-ttCUUGC U U A A A U A U U C A C C G-5`

Antisense: 5`-GAACGAAU U U A U A A G U G G C t t-3`

SOCS3

Sense: 3`-ttCGAGAACCUCGACU U C C A G-5`

Antisense: 5`-GCUCUUGGAGCUGAAGGU C t t-3`

shRNA

MWG-Biotech

Kontrolle (nicht-genomisch)

Sense: 3`-TCTCACCATTGCCTGTTCAAAGTTCTCTTG

AACAGGCAATGGTGAGAAATCGA-5`

Antisense: 5`-AGAGTGGTAACGGACAAGTTTCAAGAGAACTT

GTCCGTTACCACTCTTT-3`

SOCS3

Sense: 3'-CTGGAAGTCGAGGTTCTCGAAGTTCTCTCGAG
AACCTCGACTTCCAGTCCA-5'
Antisense: 5'-GACCTTCAGCTCCAAGAGCTTCAAGAGA
GCTCTTGGAGCTGAAGGTC-3'

Primer für PCR und rtPCR

β-Actin

MWG-Biotech

Forward: 5'-CCCAGATCATGT TTGAGACCTTC-3'
Reverse: 5'-ATGGCATGGGGGAGGGCATA-3'

SOCS3

MWG-Biotech

Forward: 5'-GACCAGCGCCACTTCTTCAC-3'
Reverse: 5'-CTGGATGCGCAGGTTCTTG-3'

Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Gelen

2 x Annealing-Puffer (pH 7,8)

20 mM Tris
100 mM NaCl
0,2 mM EDTA

5 x Auftragspuffer

62,5 mM Tris-HCl
2 % SDS
0,5 % Bromphenolblau
5 % β -Mercaptoethanol
20 % Glycerin

1 x Blotpuffer

1 x Tris-Glycin-Puffer
20 % Methanol

Calciumchlorid/ Tris-Lösung (pH 7,4)

100 mM CaCl₂
5 mM Tris

Glycerin-haltige Calciumchlorid/ Tris-Lösung (pH 7,4)

100 mM CaCl₂
5 mM Tris
14 % Glycerin

10 x Laufpuffer (pH 8,5)

240 mM Tris-Base
190 mM Glycin
0,1 % SDS

4 x Lower Tris (pH 8,8)

1,5 M Tris-Base

0,4 % SDS

Magnesiumchlorid/ Tris-Lösung (pH 7,4)100 mM MgCl₂

5 mM Tris

10 x NET-G-Puffer

1,5 M NaCl

50 mM EDTA

500 mM Tris-Base

0,2 % Gelatine

0,5 % TritonX

Ponceau-S-Lösung

0,1 % Ponceau S

5 % Essigsäure

SDS-PAGE-Gele

Lösung	Sammelgel	Trenngel (12%)
AA/BAA 40% (w/v)	0,5 ml	1,5 ml
4x Lower Tris		1,25 ml
4x Upper Tris	1,25 ml	
Glycerin 87%		1 ml
Aqua dest.	1,6 ml	1,25 ml
APS 40%	9 µl	10 µl
TEMED	9 µl	6 µl

10 x TAE-Puffer

400 mM Tris

10 mM EDTA

200 mM Eisessig

TE-Puffer (pH 7,5)

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

10 x Tris-Glycin-Puffer

120 mM Tris-Base

960 mM Glycin

4 x Upper Tris

500 mM Tris-HCl

0,4 % SDS